

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología I**



**ESCLEROSIS MÚLTIPLE: ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN  
DE LA GENÉTICA CON LOS FACTORES AMBIENTALES,  
LA RESPUESTA INMUNE Y EL TRATAMIENTO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

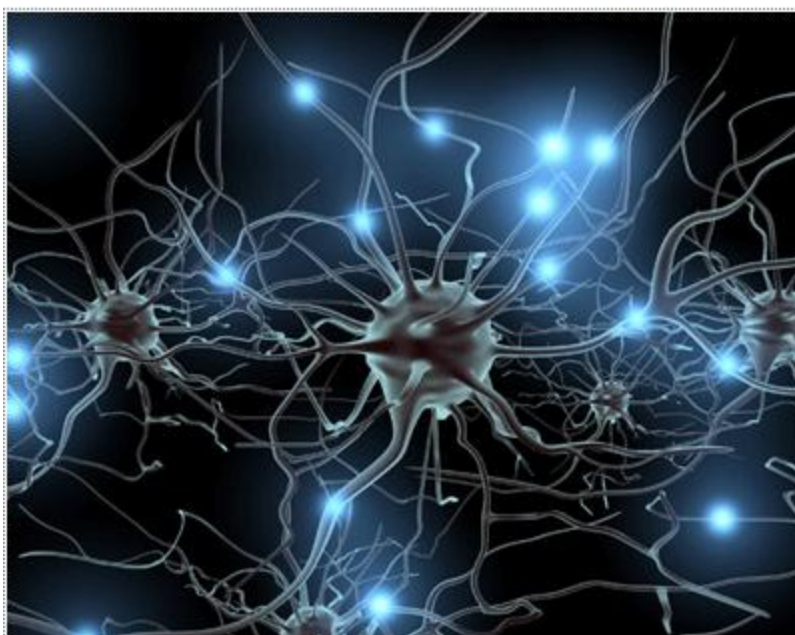
**Fiona Blanco Kelly**

Bajo la dirección de los doctores

Elena Urcelay  
Miguel Fernández Arquero

**Madrid, 2012**

***Esclerosis Múltiple:  
estudio de asociación de la genética  
con los factores ambientales, la  
respuesta inmune y el tratamiento***



***Fiona Blanco-Kelly  
18 de Abril de 2012***







# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

### **DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**

**Servicio de Inmunología, Hospital Universitario**

**Clínico San Carlos, Madrid**



**La realización de este trabajo ha sido posible gracias a Elena Urcelay y Miguel Fernández Aquero (directores del presente trabajo).**

**La realización de esta tesis se ha visto facilitada gracias a Emilio Gómez de la Concha (Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid), a la financiación otorgada por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, para desarrollar los proyectos de investigación PI07/0353 y PI07/0369 y a la Red Española de Esclerosis Múltiple (RETICS-REEM RD07/0060).**









## A CONCHI L. L.

*Taminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Taminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Taminante no hay camino  
sino estelas en la mar.*

*Antonio Machado (1875-1939 d. c.)*







# Índice

<b>Introducción</b>	19
<b>A. Etiopatogenia</b>	22
1. Lesión neuronal en la EM	23
2. El SI en la EM	24
2.1. Componentes del SI en la EM	24
2.1.1. Células B	24
2.1.2. Linfocitos T	25
2.1.3. Otros	26
2.2. Alteración del SI en la EM	27
2.2.1. Linfocitos B	27
2.2.2. Linfocitos T	27
2.2.3. Otros elementos reguladores	28
3. Genética y epigenética	29
3.1. Epidemiología genética de la EM	29
3.2. Análisis de susceptibilidad genética de la EM	30
3.2.1. Moléculas HLA y la EM	32
3.3. Epigenética en la EM	34
4. Medioambiente	36
4.1. Los virus en la EM	37
4.1.1. Virus Epstein-Barr en la EM	38
4.1.2. Virus HHV6 en la EM	39
4.1.3. Retrovirus endógenos humanos (HERV) asociados a la EM	40
4.2. Otros agentes infecciosos (bacterias)	40
4.2.1. "Clamidia pneumoniae"	41
<b>B. Farmacogenética</b>	42
<b>C. Genes estudiados</b>	44
1. TLR4	44
2. MCP/CD46	47
3. TNFRSF14/HVEM/HVEA	48
4. TNFRSF6B/DcR3	50
5. TNFRSF5/CD40	51
6. IL27	52
7. Foxp3/Scurfin/JM2	53
8. GPC5	54

9. <i>PODXL</i> .....	55
<b>Objetivos</b> .....	59
<b>Materiales y Métodos</b> .....	63
A. Muestras .....	63
1. Casos .....	63
2. Controles .....	65
B. Materiales .....	66
1. Material instrumental .....	66
1.1. Material general de laboratorio .....	66
1.2. Material específico .....	67
2. Reactivos .....	67
C. Métodos .....	69
1. Obtención del ADN a partir de sangre periférica .....	69
1.1. Calidad y rendimiento de la extracción de ADN .....	69
2. Estudio de los genes de Clase II DRB1, DQA1 Y DQB1 .....	70
3. Estudio de los alelos del gen <i>HLA-DR2</i> .....	70
D. Estudio de los polimorfismos .....	71
E. Tipado del microsatélite de <i>Foxp3</i> .....	73
F. Análisis de la presencia de HHV6 .....	74
G. Estudio de la respuesta al tratamiento .....	75
H. Análisis de datos .....	76
1. Estudio caso-control .....	76
2. Estudio de Haplotipos .....	77
3. Tagging .....	77
<b>Resultados y Discusión</b> .....	81
A. Genes Analizados .....	81
1. <i>TLR4</i> .....	83
1.1. Genotipado .....	83
1.2. Estratificación .....	85
1.2.1. <i>HLA-DRB1*15:01</i> .....	85
1.2.2. Forma Clínica .....	86
1.2.3. Resto de estratificaciones .....	87
1.3. Cálculo de DL y estimación de Haplotipos .....	88
1.3.1. Estratificación de haplotipos .....	90
2. <i>CD46</i> .....	91
2.1. Genotipado .....	92
2.2. Estratificación .....	93

2.2.1 HLA-DRB1*15:01 .....	93
2.2.2. Progresión .....	95
2.2.3. Edad de Debut.....	97
2.2.4. Resto de estratificaciones .....	98
2.3. Cálculo de DL y estimación de Haplotipos. ....	99
2.3.1. Estratificación de haplotipos.....	101
3. TNFRSF14 .....	106
3.1. Genotipado.....	107
3.2. Estratificación.....	108
3.2.1. HHV6.....	108
3.2.2. Resto de estratificaciones .....	109
4. TNFRSF6B.....	111
4.1. Genotipado.....	111
4.2. Estratificación.....	113
4.2.1. Forma Clínica.....	113
4.2.2. Resto de estratificaciones .....	114
4.3. Interacción entre TNFRSF14 y TNFRSF6B .....	114
5. CD40 .....	118
5.1. Genotipado.....	118
5.2. Estratificación.....	120
5.2.1. Forma Clínica.....	120
5.2.2. Resto de Estratificaciones .....	121
6. IL27 .....	122
6.1. Genotipado.....	122
6.2. Estratificación.....	123
7. Foxp3 .....	125
7.1. Genotipado.....	126
7.2. Estratificación.....	130
7.2.1. HLA-DRB1*15:01 .....	130
7.2.2. Resto de estratificaciones .....	131
7.3. Cálculo del DL y estimación de Haplotipos .....	131
7.3.1. Estratificación de haplotipos.....	133
8. GPC5.....	135
8.1. Genotipado.....	135
8.2. Estratificación.....	138



8.2.1. <i>HLA-DRB1*15:01</i> .....	138
8.2.2. Edad de Debut.....	139
8.2.2. Resto de estratificaciones .....	141
9. <i>PODXL</i> .....	142
9.1. Genotipado del SNP. ....	142
9.2. Estratificación del SNP.....	143
B. Farmacogenética.....	145
I. <i>TLR4</i> .....	147
II. <i>CD46</i> .....	149
III. <i>CD40</i> .....	150
IV. <i>GPC5</i> .....	151
V. Resto de genes analizados ( <i>TNFRSF6B</i> , <i>TNFRSF14</i> , <i>IL27</i> , <i>Foxp3</i> y <i>PODXL</i> ).....	153
<b>Conclusiones</b> .....	157
A. Genes Analizados .....	157
B. Farmacogenética.....	159
<b>Agradecimientos</b> .....	163
<b>Bibliografía</b> .....	169
<b>Índice de abreviaturas</b> .....	213
<b>Índice de figuras</b> .....	219
<b>Publicaciones</b> .....	223
A. Artículos .....	223
Revista internacionales .....	223
C. Posters.....	224
Congresos internacionales.....	224
Congresos nacionales.....	225

*Oír o leer sin reflexionar es una ocupación inútil.*

*Confucio (551 -478 a.c.)*



# Introducción

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad neurológica crónica, inflamatoria y desmielinizante mediada por el Sistema Inmune (SI) que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC)<sup>1 2</sup>.

En los países desarrollados supone la segunda causa de enfermedad neurológica adquirida en jóvenes (por detrás de los traumatismos craneoencefálicos). En la población española la prevalencia de esta enfermedad se estima en 60 casos por cada 100.000 habitantes<sup>3</sup>.

La EM comienza por la aparición de lesiones inflamatorias agudas, generalmente subclínicas, cuya duración se estima en un mes y que dañan la barrera hematoencefálica (BHE). Se estima que estas lesiones tienen una frecuencia 10 veces superior a los brotes clínicos<sup>1</sup> y una vez resueltas dejan a nivel encefálico una zona lesionada que puede verse mediante técnicas de imagen convencional (Resonancia Magnética -RM-). Estas lesiones dan nombre a la enfermedad, ya que son placas escleróticas que se ubican a lo largo de diferentes zonas del encéfalo y de la médula espinal. Estas lesiones se presentan como una zona de desmielinización con un borde nítido, que las separa del resto del tejido encefálico mielinizado, y presentan infiltración perivascular de células del SI, principalmente linfocitos T -LT- (CD4+ y CD8+, -CD: Cluster de diferenciación-) durante la fase aguda de formación de la lesión<sup>4</sup>.

Se piensa que durante la progresión de la enfermedad la inflamación afecta de forma difusa, dañando todo el tejido nervioso, provocando daño axonal y acumulándose una proteína precursora amiloide. Al final del proceso degenerativo las lesiones que comenzaron dañando la vaina de mielina y acabaron dañando el tejido axonal, configuran una placa esclerótica que contiene tejido glial cicatricial generado por astrocitos activados y que es visible macroscópicamente<sup>5</sup>.

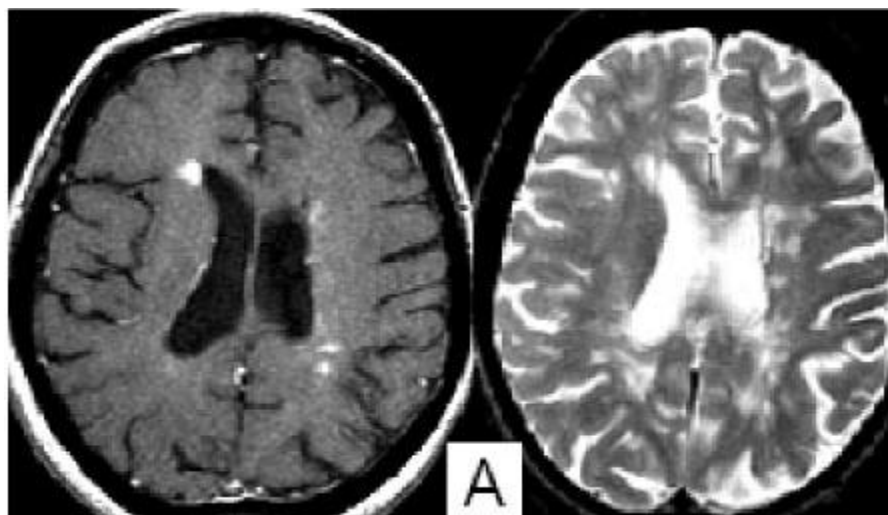
Se aceptaba que la EM era una enfermedad que dañaba sólo a la sustancia blanca cerebral. Sin embargo, gracias a estudios histopatológicos, se ha comprobado que existe

afectación durante estadios tempranos de la sustancia gris, provocando desmielinización de la región cortical en formas progresivas de EM<sup>6</sup>.

La EM es una enfermedad heterogénea en cuanto a expresión clínica y progresión. La clínica viene determinada por las zonas donde se encuentran las placas de lesión a nivel del SNC, siendo la clínica más habitual: diplopía oftalmoplégica, espasticidad (de cualquier articulación), alteraciones de la percepción sensitiva (paraparesias), incontinencia vesical y rectal y síntomas inespecíficos como la debilidad o el dolor. Puede causar déficits cognitivos (45-65% de los pacientes) que van desde lentitud en el pensamiento (bradipsiquia) a graves alteraciones del lenguaje. El aspecto más relevante de la clínica es el impacto que esta provoca en las vidas de los pacientes ya que les hace totalmente dependientes, a pesar de no reducir significativamente su esperanza de vida.

La clasificación clínica de la EM se realiza en base al fenotipo clínico, RM para la visualización de placas, registro de potenciales evocados (PEV) cerebrales y análisis bioquímico del líquido cefalorraquídeo (LCR). Muchos pacientes presentan niveles anormalmente elevados de IgG oligoclonal en el LCR. La progresión de la EM puede variar desde un episodio aislado a muerte en el plazo de un año, y clásicamente se distinguen 4 modelos principales de progresión en función del debut y la evolución de la enfermedad:

*Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (RR)*: es la forma más frecuente (85-90%) y está caracterizada por brotes con afectación de diversos sistemas que alternan con periodos de remisión de la sintomatología en los que se recupera parte de (o todas) las capacidades perdidas. Con el tiempo, en cada brote las capacidades recuperadas son menores, observándose la progresión de uno o más síntomas, hasta un momento en el que no es posible discernir entre un brote y el siguiente, al no objetivarse mejoría tras los brotes y sí un empeoramiento progresivo de la enfermedad, esta forma clínica pasa a ser considerada como la forma Secundaria Progresiva (SP). La transición entre estas 2 formas clínicas se produce en un 30-50% y el tiempo de evolución es variable y aún no predecible<sup>7 8</sup>. La progresión hacia la cronicidad puede observarse por técnicas de imagen, con una pérdida progresiva e irreversible del tejido cerebral (atrofia) junto con un incremento del volumen ventricular<sup>9</sup> (Fig. 1).



**Fig. 1.** RM T2 cerebral en paciente de 51 años con EM. Izquierda: presenta atrofia cerebral, placas escleróticas e incremento del volumen ventricular. Derecha: mismo paciente RM T2 con contraste<sup>9</sup>.

*Forma Primaria Progresiva (PP):* caracterizada por un deterioro continuo y progresivo desde el inicio de la enfermedad sin existir remisiones. Esta forma es la más agresiva y de más rápida progresión, afecta al 10% de los pacientes. Existen algunos casos, en muy baja proporción (1-5%) de la forma Progresiva Recurrente (PR), que presentan una evolución similar a la PP a la que se añaden recaídas con o sin recuperación completa; de forma que los períodos entre brotes se caracterizan por una continua progresión<sup>10</sup>.

A su vez en la EM se observan también 4 patrones distintos de desmielinización basados en: la ausencia/presencia de depósito de IgG y complemento, la pérdida de mielina, los patrones de degeneración oligodendrocítica y la respuesta inmune dominante<sup>11</sup>.

Se sabe que en las lesiones definitivas de la EM existe presencia de complemento, anticuerpos (Ac), y receptores Fc $\gamma$  en macrófagos fagocíticos. Esto ha llevado a sugerir que el mecanismo de desmielinización en la EM establecida está producido principalmente por la fagocitosis de la mielina mediada por el depósito de Ac y complemento<sup>12</sup>. Sin embargo, el hecho de que las lesiones iniciales pueden desaparecer al formarse esta lesión definitiva y que en placas alejadas de los vasos sanguíneos predominan células gliales y apoptosis de oligodendrocitos, hace que se planteen mecanismos etiopatogénicos alternativos<sup>13 14</sup>. Además existen estudios patológicos de las lesiones en las que se observa solapamiento entre EM y otras patologías cerebrales, como la presencia de lesiones de tipo isquémico<sup>15 16</sup>. Por todo ello algunos autores defienden una acción conjunta entre los factores inflamatorios y degenerativos en la patogenia de la EM.

## A. Etiopatogenia

Ya en el siglo XIX Jean Martin Charcot describió las bases etiopatogénicas de la EM; sin embargo, aún están por desentrañar diversos e importantes factores de la etiología y la patología de esta enfermedad. Estudios recientes acerca de la base genética de la enfermedad han aportado claves importantes en el camino para el esclarecimiento, al menos parcial, del origen de la misma<sup>17</sup>.

Existe el consenso de que la EM resulta de la interacción entre factores genéticos, (atestiguado tanto por la agrupación familiar de casos, como por la alta tasa de concordancia en gemelos monozigóticos 6-11 veces mayor que en gemelos dizigóticos<sup>18-20</sup>) y factor/es ambiental/es<sup>21</sup>. Entre los factores ambientales, se barajan los agentes infecciosos, las toxinas e incluso los déficits nutricionales<sup>22</sup>, pero el factor desencadenante de la formación de péptidos inmunogénicos derivados de mielina sigue sin conocerse<sup>23</sup>.

Muchas de las hipótesis que se barajan defienden que la EM es una enfermedad autoinmune. Una de ellas plantea que la desmielinización mediada por el SI se produce por un mecanismo de mimetismo molecular, desencadenado por proteínas de origen viral o bacteriano tras una infección inespecífica<sup>24</sup>. Otra hipótesis es la acción proteolítica de los Ac contra la proteína básica de mielina (PBM), cuya presencia ha sido descrita en el suero de los pacientes con EM<sup>25</sup>. Sin embargo, ciertas líneas de investigación proponen que la EM es más que una enfermedad autoinmune, haciendo hincapié en que la desmielinización (e incluso la neurodegeneración) pueden darse en el cerebro de un afecto de EM independientemente de la lesión inflamatoria<sup>26</sup>.

Actualmente se discute si el SI juega un papel primario en la patología de la EM, pero tanto la presencia de infiltrados de células mononucleadas en las lesiones activas, como la efectividad terapéutica de Ac monoclonales frente a linfocitos en el tratamiento de la EM dejan claro que en esta enfermedad existe una disfunción en el SI<sup>27</sup>.

## **1. Lesión neuronal en la EM**

Clásicamente se ha considerado la EM como una enfermedad provocada por la pérdida de mielina, sin embargo, estudios más recientes apuntan a que la verdadera causa de la sintomatología de esta patología se debe al daño axonal<sup>28-31</sup>. Se acepta que además del proceso inflamatorio agudo existe una degeneración que incluye la pérdida axonal en las zonas lesionadas, daño difuso de la sustancia blanca en regiones lejanas a las de las lesiones e implicación en el proceso de la sustancia gris tanto cortical como profunda<sup>32</sup>. Se piensa que el daño axonal no es un evento secundario, ya que existe daño axonal y de la sustancia gris en periodos tempranos de la enfermedad, en ausencia de lesiones típicas de EM<sup>28</sup>. Por lo tanto, se postula que el daño axonal pudiera preceder a la desmielinización al existir en fases iniciales de la EM una pérdida difusa de axones<sup>31</sup>.

La desmielinización es un factor de riesgo para el daño axonal al generar una situación en la que el axón es susceptible de ser dañado, tanto por la pérdida de la interacción axoglial, como por el ataque inmunológico al axón desnudo. A raíz de distintos estudios, la teoría del ataque autoinmune parece la más plausible<sup>33</sup>.

Muchos mecanismos inmunes contribuyen al daño axonal (efecto directo de citoquinas proinflamatorias, fijación del complemento, apoptosis, citotoxicidad celular y neurodegeneración) y el grado de daño que cada uno de ellos provoca parece diferir de unos pacientes a otros<sup>30</sup>, pero está presente en todos ellos.



## 2. El SI en la EM

### 2.1. Componentes del SI en la EM

#### 2.1.1. Células B

La presencia de estas células ya sea en forma de Linfocitos B (LB), de células plasmáticas (CP), o de sus productos en el LCR, junto con la reducción de brotes en pacientes mediante la reducción de LB, parecen dejar claro su importancia en la EM.

En las lesiones del SNC de EM existe expansión clonal de LB (incluso en fases tempranas de la EM), e hipermutación somática de LB (CD19+) y CP (CD138+)<sup>34 35</sup>.

La proporción entre LB y LT se relaciona con la clínica en la Encefalopatía Autoinmune Experimental (EAE)<sup>36</sup>. Los LB pueden generar respuestas autoinmunes por mimetismo molecular, pudiendo ser responsables del inicio de la enfermedad al desencadenar una reacción autoinmune tras el reconocimiento de un factor ambiental aún no esclarecido.

Los LB tienen muchas funciones: migración, acción como células presentadoras de antígenos (APC), producción de Ac y citoquinas, y coestimulación. En el contexto de la EM cabe destacar que:

Existe una formación de folículos B ectópicos en las meninges de pacientes con EM<sup>37</sup>, que se asocia a una mayor pérdida de neuritas, desmielinización y activación microglial<sup>38</sup>.

En pacientes con EM, las APC responden a un epítipo específico de mielina<sup>39</sup>, de forma que la interacción LT-LB podría resultar en una generación de autoanticuerpos con capacidad de inducir la desmielinización observada en estos pacientes<sup>40</sup>.

En más del 90% de los pacientes con EM existe producción intratecal, por parte de las CP, de inmunoglobulina oligoclonal de tipo IgG<sup>41</sup>, que ha sido relacionada con el pronóstico<sup>42</sup>. En los pacientes con EM, la producción de IL-10 está disminuida respecto de los individuos sanos; desequilibrio que puede ser modificado por tratamientos como el interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ).

La activación de la ruta B7-CD28-CTLA4 (B71=CD80 y B72=CD86, CTLA4=Citotoxic T Lymphocyte Associated 4 –CD152-) parece jugar un papel importante en la patogenia<sup>43</sup> y en la respuesta a tratamiento con IFN $\beta$ <sup>44</sup> de la EM.

## 2.1.2. Linfocitos T

### 2.1.2.a. CD4+:

Estos linfocitos reaccionan contra la mielina y activan la microglía y los macrófagos (hecho demostrado en la EAE, modelo murino de EM) provocando una alteración de la conducción nerviosa a causa de la destrucción de la mielina<sup>45</sup>. En pacientes con EM hay CD4+ activados frente a proteínas de mielina en sangre periférica, mientras que en controles están inactivos<sup>46</sup>. Esta reacción anómala se debería a un fenómeno de mimetismo molecular que provocaría una reacción cruzada contra la PBM<sup>24</sup>. Teoría apoyada por múltiples hallazgos como la existencia de expansión oligoclonal de LT helper (Th), con receptores específicos para PBM<sup>47</sup>. La presencia de una forma inmunodominante de PBM unida a HLA-DR2 (HLA: Antígeno de Leucocito Humano) en APCs en zonas de desmielinización de enfermos de EM<sup>48</sup> o que el proceso patogénico mediado por CD4+ concuerda con la demostrada asociación entre las Moléculas HLA de clase II y la susceptibilidad a EM<sup>49</sup>.

- Los CD4+ helper 1 (Th1) parecen tener un papel relevante en la patogenia de la EM, pero su función exacta en el proceso de la EM aún se desconoce, por ello, se estudian otras poblaciones CD4+ como responsables de la autoinmunidad:

- Los Th17 son los primeros en alcanzar el pico de infiltración del SNC en la EAE<sup>50</sup>. Tanto los Th1 como los Th17 son capaces de inducir inflamación y parálisis, pero las lesiones provocadas por Th1 en la EAE presentan mayor similitud a las de la EM que las provocadas por Th17<sup>51</sup>. Se ha detectado “in vivo” que en el SNC inflamado existen células que secretan tanto IFN $\gamma$  como IL-17, sugiriendo que puede existir un estatus intermedio donde la célula CD4 secrete ambas quimioquinas, o que las APCs tengan la capacidad de activar e incluso diferenciar a los LT CD4+ hacia Th1, Th17 y Treg según la fase de la inflamación<sup>52</sup>.

- Las Treg (CD4+/CD25+/FoxP3+) están disminuidas en pacientes RR<sup>53</sup> y su equilibrio con otros subtipos CD4 se halla alterado en la EM<sup>54</sup>. Además, parecen estar estrechamente ligadas funcionalmente a las Th17<sup>55</sup>.

### 2.1.2.b. Otros Linfocitos T:

Los CD8+ están presentes en las placas de EM y existe mayor presencia de CD8+ que reconocen mielina en pacientes con EM respecto a controles<sup>56</sup>. En la EAE los CD8+ producen la lisis de los oligodendrocitos<sup>57</sup> y en autopsias de pacientes con EM existe asociación entre

CD8+ y la lesión axonal<sup>58</sup>. Es posible que los CD8+ sean mediadores directos de lesión axonal a través del reconocimiento de MHC de clase I, estando así implicados en la patogenia y la susceptibilidad a EM<sup>59</sup>. Además, su disminución provoca una reducción del número de brotes<sup>59</sup>.

Los linfocitos Natural Killer tienen capacidad inmunomoduladora<sup>60</sup> y su variación en número y función ha sido descrita en la EM<sup>61 62</sup> y en pacientes tratados con INF $\beta$ <sup>63</sup>.

Los linfocitos  $\gamma\delta$ , cuya presencia se ha descrito en la EM<sup>64 65</sup>, donde parecen tener una función en el daño inicial<sup>66</sup>.

En la EM existe alteración de las funciones de los LT, así:

El proceso inflamatorio desencadenado por los LT autorreactivos<sup>67</sup> podría provocar una alteración de la BHE<sup>68</sup> que permitiese su entrada al SNC; entrada que parece ser favorecida por las Células Dendríticas (Cd) a través de su función de APC<sup>69</sup>.

La acción de los LT está condicionada por múltiples moléculas, que podrían constituir dianas terapéuticas y estar implicadas en la EM a través de su acción coestimuladora. Así, miembros de la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF) han mostrado asociación con la predisposición a EM<sup>70</sup>.

La presencia de alteración del equilibrio de citoquinas de LT, que pueden presentar un papel tanto pro- como anti- inflamatorio, genera una compleja red, aún por dilucidar, en el proceso patogénico de la EM<sup>71</sup>.

### 2.1.3. Otros

Existen otros elementos del SI implicados en el proceso de la EM:

- Las Cds, que podrían estar ligadas a la expansión de Treg. Así, la presencia de Cds inmaduras genera una interacción alterada con las Treg<sup>72</sup>. Las Cds podrían contribuir al cese de la inflamación en el SNC<sup>73</sup>. En la EAE, pueden actuar tanto de forma tolerogénica como inmunogénica<sup>69</sup>, y en los pacientes con EM existe aumento de las mismas<sup>74 75</sup>. Además producen IL-27, que genera una respuesta inmune efectiva coordinando la producción de citoquinas por parte de Th1, Th17 y Treg, y cuyos niveles se correlacionan con la severidad de la EAE<sup>76</sup>.

- El Complemento, que libre o unido a mielina, está presente en el cerebro y los fluidos de pacientes con EM<sup>77 78</sup>. Se piensa que desempeña una acción proinflamatoria en la fase aguda de la enfermedad, pero también pudiera tener un efecto protector frente a la apoptosis de los oligodendrocitos<sup>79</sup>.

## **2.2. Alteración del SI en la EM**

Existe alteración funcional en múltiples elementos del SI (células, rutas, moléculas coestimuladoras...) lo que hace que se piense que la EM, al igual que otras enfermedades autoinmunes, se deba a una alteración de la regulación del mismo.

### **2.2.1. Linfocitos B**

Los LB presentan varios mecanismos de regulación<sup>80</sup>, la alteración de estas funciones regulatorias han sido observadas en la EAE. Existen subpoblaciones de LB reguladores productores de IL-10<sup>81</sup>, el reclutamiento de Treg al SNC suprime la EAE a través de un mecanismo dependiente de IL-10<sup>82</sup>.

### **2.2.2. Linfocitos T**

Se conocen muchas alteraciones en la función de estas células en el contexto de la EM. Se presta especial atención a las Treg, que se caracterizan funcionalmente por ser un elemento clave en el control de la respuesta inmune. En la EAE la ausencia/depleción se correlaciona con un aumento de la severidad de la EAE<sup>83</sup>, mientras que su presencia en el SNC se asocia a remisión y recuperación<sup>84</sup>. En la EAE las Treg con función mielina-específica se acumulan en el SNC, pero fracasan en el control de la inflamación<sup>50</sup>. Las Treg obtenidas de pacientes con EM son disfuncionales *in vitro*<sup>85 86</sup> y la disminución de niveles de Foxp3 en las Treg en pacientes con EM se asocia a pérdida de función de éstas<sup>87</sup>.



### 3. Genética y epigenética

#### 3.1. Epidemiología genética de la EM

Numerosos estudios poblacionales apoyan la idea de la existencia de factores genéticos en la EM. Se sabe que su prevalencia es mayor en caucásicos y España se encuentra en un punto intermedio-alto 50-80/100000 habitantes<sup>92-94</sup> (Fig. 3). La incidencia de esta enfermedad es baja en la infancia, aumentando a partir de los 18 años y alcanzando su pico entre los 25 y 35 años (es rara después de los 50 años). Las mujeres presentan un riesgo 1,5-2,5 veces mayor que los hombres<sup>95</sup> y se ha observado un mayor riesgo de transmisión de susceptibilidad por vía materna<sup>96</sup>.

Los estudios de agregación familiar también sustentan la idea de una predisposición genética. Mediante el uso de la proporción de riesgo de recurrencia ( $\lambda$ ) (comparación de las tasas de recurrencia en familiares frente a las tasas de recurrencia en población general) se ha observado que el riesgo de recurrencia familiar disminuye al alejarse en el linaje<sup>97</sup>. Esta agregación sugiere la existencia de una herencia no mendeliana de la EM. Esta hipótesis es apoyada también por la concordancia de las tasas de afectación de gemelos monozigóticos (25-30%) frente a las tasa en gemelos dizigóticos (5%)<sup>98</sup>. Se podría pensar que esta agregación familiar se debería no a genes compartidos sino a la dieta, el estilo de vida o la infección; sin embargo los miembros adoptados de una familia en la que existe EM tienen el mismo riesgo de padecer la enfermedad que la población general<sup>1</sup>.

Los modelos hereditarios que analizan múltiples genes con penetrancia incompleta son concordantes con las tasas de riesgo familiar observadas en la EM<sup>99</sup>.

Por otro lado en el análisis conjunto de asociación de distintas enfermedades autoinmunes se observa solapamiento en las regiones de riesgo<sup>100</sup>. Esto apoya la teoría de que existen genes de susceptibilidad comunes para enfermedades autoinmunes clínicamente distintas. Además, la prevalencia de distintas enfermedades autoinmunes es mayor (respecto de la población general) en familias donde existe riesgo elevado de sufrir alguna de ellas<sup>101 102</sup>. Muchos estudios han encontrado relación entre un gen y varias enfermedades autoinmunes<sup>100</sup>

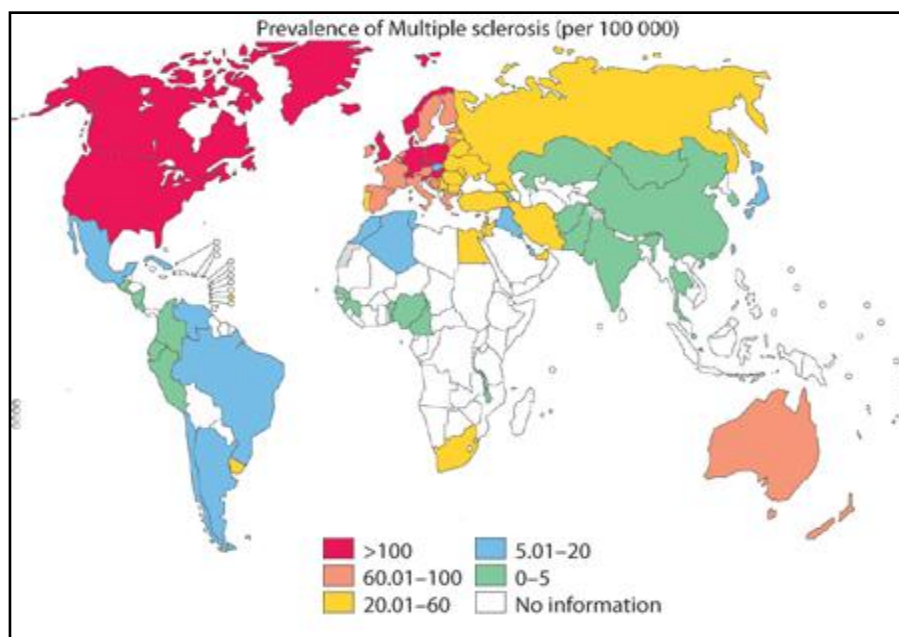


Fig. 3. Prevalencia mundial de la EM por cada 100.000 habitantes<sup>105</sup>.

### 3.2. Análisis de susceptibilidad genética de la EM

Se han empleado múltiples estrategias para la determinación de genes de susceptibilidad a EM. Se han empleado análisis de ligamiento de genoma completo (WGS - whole genome scan-) a través de marcadores multialélicos (microsatélites). El desequilibrio de ligamiento (DL) se define como la aparición conjunta de determinados alelos que se encuentran en distintos loci con una frecuencia mayor a la que se esperaría por azar; es decir, en dicha zona el fenómeno de recombinación es muy escaso o incluso nulo y determinadas combinaciones alélicas se heredan en bloque de padres a hijos formando lo que se denominan *haplotipos*. Los análisis de ligamiento permiten identificar regiones genómicas que predispongan para la enfermedad observando individuos emparentados (se espera que los parientes muestren un exceso de haplotipos idénticos en la región que contenga una variante causante de la enfermedad<sup>106</sup>).

A estos estudios de ligamiento se añade el metanálisis de los mismos con el fin de aunar y validar los distintos resultados encontrados. En la EM se han llevado a cabo 10 estudios "genome-wide-linkage-studies". El metanálisis de los mismos<sup>107</sup> confirmó el ligamiento a la región HLA (6p) y a las regiones 6q, 10q y 18p.

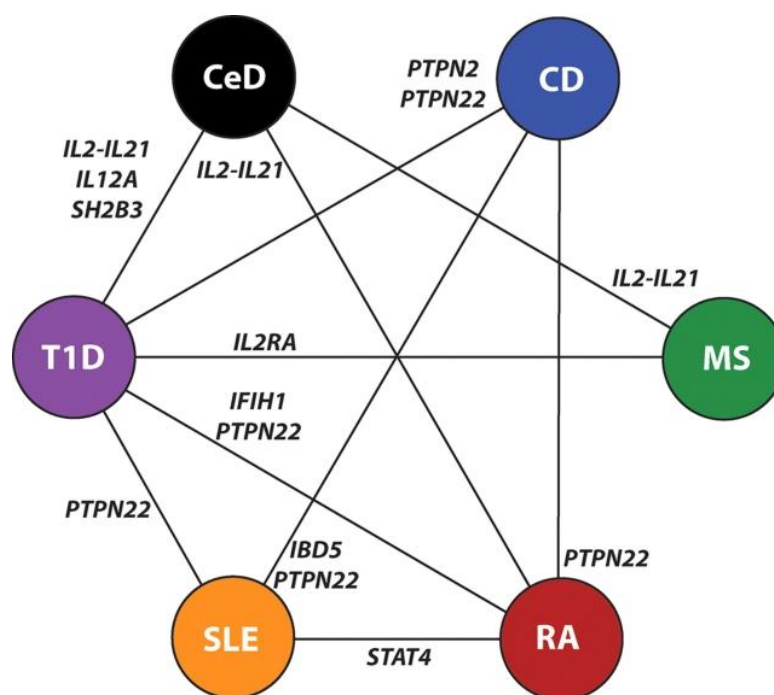
Otra estrategia empleada para analizar la susceptibilidad genética son los estudios de asociación basados en el estudio de genes candidatos. Estos estudios buscan asociación entre marcadores polimórficos de un gen y la enfermedad (los marcadores deben constituir alelos que, o bien sean causa de la enfermedad, o bien estén en alto DL con la variante causal del gen). Estos estudios tienen mayor poder estadístico que el análisis de ligamiento, lo que permite detectar asociaciones de efecto moderado. En este tipo de estudio es común el uso de SNPs como marcadores génicos.

La selección de genes candidatos se basa en su implicación en los mecanismos patogénicos de la enfermedad (genes candidatos funcionales) o en su localización en regiones genómicas en las que se haya observado previamente ligamiento a la enfermedad (genes candidatos posicionales)<sup>108</sup>.

Desde 2001 está en marcha el proyecto HapMap, en el que se clasifican millones de SNPs<sup>109</sup>, analizando el genoma de miles de personas sanas. A pesar de que la proporción de SNPs estudiados es pequeña en relación a su densidad, la selección de los mismos permite cubrir gran parte de la variabilidad génica dado el alto DL<sup>110</sup>, lo que permite restringir los segmentos de genoma a pequeños subconjuntos de variantes que identifican todos los haplotipos de una región (haplotype-tagging-SNPs)<sup>111 112</sup>.

Gracias al proyecto HapMap y al desarrollo de nuevas tecnologías se han identificado numerosas variantes comunes de ADN asociadas al riesgo de desarrollar distintas enfermedades autoinmunes<sup>113</sup> (Fig.4), mediante estudios de barrido genómico (genome wide association studies -GWAS-)





**Fig. 4.** Solapamiento entre loci de riesgo genético para enfermedades autoinmunes. Enfermedad de Crohn (-CD-), Esclerosis Múltiple (-MS-), Lupus Eritematoso Sistémico (-SLE-), Artritis Reumatoide (-RA: Rheumathoid Arthritis-), Diabetes 1 (-Tipe 1 Diabetes: T1D-) y Celiaquía (-CeD: Coeliac Disease-)<sup>100</sup>.

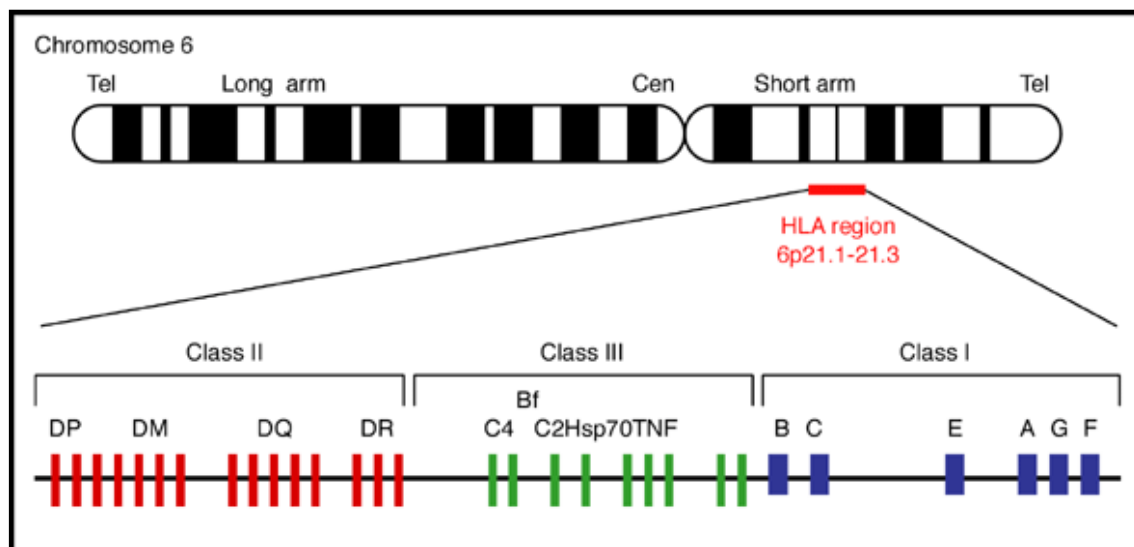
La utilización de estos nuevos recursos en el estudio de la EM ha resultado en la identificación de varios marcadores potenciales de EM. Algunos de los genes que estos marcadores delimitaban han sido confirmados<sup>114 115</sup>; sin embargo, la tasa de replicación de estos estudios es baja. Esto puede deberse a que son estudios multitest y a las bajas Odds Ratio que presentan los genes asociados, pudiendo dar lugar a falsos positivos a pesar de la estricta corrección estadística aplicada; por otro lado, esta corrección puede dar lugar a falsos negativos al desestimar asociaciones de efecto moderado-bajo.

Queda claro que los resultados encontrados en estos estudios han de ser validados por grupos independientes y que para su confirmación se necesitan grandes poblaciones.

### 3.2.1. Moléculas HLA y la EM

Esta región génica está ubicada en el cromosoma 6, en el locus 6p21.3 (Fig. 5). Presenta dos particularidades: el alto grado de polimorfismos (o variabilidad) y el alto grado de desequilibrio de ligamiento entre los mismos. Se halla dividida en tres subregiones: clase I telomérica, clase II centromérica y clase III. Los HLA de clase I y de clase II codifican

glicoproteínas altamente polimórficas de la superficie celular con una función principal de reconocimiento inmunitario. Existen genes relacionados a HLA fuera de este locus<sup>116</sup>.



**Fig. 5.** Genes HLA.

Abarca  $4 \times 10^6$  nucleótidos. TNF=Factor de Necrosis Tumoral. Hsps= Proteínas de Shock Térmico. C2 y C4: proteínas del complemento<sup>117</sup>.

En esta región existen 421 genes, de los cuales se expresan el 60% y varios de ellos se han asociado a la susceptibilidad a padecer EM principalmente los de clase II (*HLA-DQB1\*0602*, *HLA-DQA1\*0102*, *HLA-DRB1\*15:01* y *HLA-DRB5\*0101*)<sup>118</sup>.

La asociación más intensa entre HLA y la EM encontrada hasta el momento, descrita en los años 70, es la del locus *HLA-DRB1*, que confiere susceptibilidad en la población caucásica, incluyendo la española<sup>119</sup>. A principios de los años 90 se especificó el alelo que mayor susceptibilidad confiere, el *HLA-DRB1\*15:01* y se objetivó que casi un tercio de los enfermos de EM son positivos para este alelo<sup>49</sup>, explicando el 15%-35% de la base genética de la enfermedad. Nuestro grupo de trabajo, también encontró asociación entre alguno de los polimorfismos de estos genes de la región HLA y la EM<sup>120</sup>. Se han descrito otros alelos con efecto modificador (*HLA-DRB5*)<sup>121</sup> y haplotipos y alelos protectores frente a EM (*HLA-C\*05*)<sup>122</sup>.

La relación entre el HLA y las enfermedades autoinmunes aún no está completamente esclarecida. Se piensa que una presentación antigénica aberrante a los LT autorreactivos (antígenos exógenos o endógenos) por parte de las moléculas HLA clase II, provocaría un fallo en el mecanismo de inmunotolerancia. Así, ciertos alelos de HLA clase II dirigirían la respuesta a determinados autoantígenos dando lugar a asociaciones específicas de enfermedad<sup>123</sup>. Los estudios de heredabilidad de alelos HLA de resistencia a EM hacen pensar que esta teoría de

presentación restrictiva de *HLA-DRB1\*15:01* es demasiado simple para la compleja asociación que parece existir entre los genes HLA y la EM<sup>124</sup>.

Se han realizado numerosos análisis de la relación del HLA con el fenotipo clínico<sup>125 126</sup>, y la más clara parece ser entre *HLA-DRB1\*15:01* y la precipitación de los pacientes RR hacia la forma SP<sup>127</sup>.

La asociación HLA-EM explica un bajo porcentaje de la heredabilidad de EM, lo que sugiere la existencia de otros genes, modificaciones epigenéticas<sup>128</sup> y otros factores multifactoriales causantes de enfermedad, interactuando en el desarrollo de la misma<sup>129</sup>.

### 3.3. Epigenética en la EM

Varios de los hallazgos derivados de los estudios genéticos epidemiológicos implican la influencia de factores epigenéticos en la EM, como el incremento de la proporción mujer-hombre en los últimos 60 años<sup>95</sup> o la influencia del género del progenitor afecto en el riesgo de la descendencia<sup>130 131</sup>. En estas diferencias parecen estar implicadas parcialmente en las modificaciones epigenéticas ocurridas en los HLA de clase II<sup>131</sup>. Por el contrario, el estudio de la inactivación del X no explica la predominancia de EM en mujeres, aunque sí parece diferente entre pacientes RR y PP<sup>132</sup>. Así mismo, algunas de las hipótesis barajadas en cuanto al desarrollo de la EM han implicado factores ambientales como moduladores de la epigenética celular<sup>133</sup>.

Otros reguladores epigenéticos que podrían estar implicados son las histonas y las hormonas. Se ha observado que en los procesos de inflamación y neurodegeneración, el balance existente entre los distintos tipos de histonas parece influenciar los mecanismos de la EM<sup>134</sup> y que la expresión de genes HLA de clase II está íntimamente ligada a las mismas<sup>135</sup>. Por otro lado se sabe, desde hace más de 40 años, que los esteroides sexuales modulan epigenéticamente la expresión genética<sup>136</sup>.

Se postula que la ineficiencia de los procesos epigenéticos de regulación de diferenciación de los oligodendrocitos conduce a un fallo en la remielinización<sup>137</sup>, aunque recientes estudios GWAS, no han encontrado diferencias epigenéticas entre gemelos monoigóticos en la EM<sup>138</sup>.

Todos estos datos conducen a pensar que en el estudio de la EM no se puede desestimar el análisis de los procesos epigenéticos para el completo entendimiento de esta compleja patología<sup>128 139</sup>.

## 4. Medioambiente

Una de las múltiples posibles causas implicadas en el desarrollo de EM es la acción de un agente ambiental en un individuo genéticamente susceptible<sup>140</sup>. Hasta el día de hoy, los estudios al respecto son discrepantes y no determinantes<sup>141</sup>. Esto puede deberse a que los posibles agentes ambientales sean muy prevalentes entre los individuos con y sin EM, lo que implica la necesidad de grandes muestras para la identificación del efecto del agente ambiental sobre la población<sup>142</sup>. La situación se complica por el hecho de que la EM probablemente presente un largo periodo de latencia entre la exposición y la aparición de los síntomas.

Es importante a la hora de analizar los posibles factores medioambientales tener en cuenta la distribución geográfica que presenta esta enfermedad. Los primeros datos disponibles sobre la EM son de los países escandinavos (Suecia, Noruega y Finlandia), donde parece posible que se originase la enfermedad<sup>143</sup>. La prevalencia de la EM aumenta al ascender de latitud, por lo que se ha sugerido que esta variación geográfica se deba a variaciones en la frecuencia de los genes de susceptibilidad, teoría apoyada por el hecho de que la EM es más frecuente en personas de origen caucásico<sup>144</sup>. Sin embargo, otros autores defienden que este gradiente es un reflejo de la interacción entre los genes y el ambiente<sup>145</sup> o que estas diferencias geográficas se deben a la exposición solar y su implicación en el metabolismo de la vitamina D. Esta vitamina sería protectora frente a la EM<sup>146</sup>, aunque no existe relación entre exposición solar (aisladamente) y EM, por lo que se piensa que la dieta también está implicada en el efecto protector de la vitamina D<sup>147</sup>. El papel de la vitamina D en la EM se ve reforzado por la existencia de una región de respuesta a vitamina D en el promotor de *HLA-DRB1*, que está conservado en los haplotipos *HLA-DRB1\*15*, pero no en el resto<sup>148</sup>, resaltando la conexión entre factores medioambientales y factores genéticos en la etiopatogenia de la EM.

Otro factor medioambiental consistente con las variaciones geográficas es el infeccioso<sup>149</sup>. Se ha sugerido que el daño tisular encontrado en la EM podría deberse a una infección en la que la respuesta inmune fuera dirigida frente al agente infeccioso<sup>150</sup>. Esta teoría se basa en que la mayor parte del daño encontrado en las infecciones crónicas es debido a un mal control de la respuesta inmune, y que un mecanismo similar podría estar ocurriendo en

otras enfermedades crónicas con desencadenante infeccioso. Además, la mayoría de las enfermedades crónicas inflamatorias del SNC son infecciosas<sup>151</sup>.

Dentro de la hipótesis infecciosa se postulan varias teorías:

- La primera teoría al respecto sostiene que el factor infeccioso es un agente ampliamente diseminado en la población humana (más que un patógeno raro), y que éste es un virus que incrementa el riesgo de EM si la infección ocurre entre la infancia y la primera juventud<sup>152</sup>.

- La segunda teoría postula que el agente infeccioso responsable de la EM es más frecuente en las regiones de mayor prevalencia de EM, de forma que en la mayoría de los individuos se produce una infección crónica asintomática, y sólo en casos excepcionales y años después de la exposición primaria, se produce la EM<sup>153</sup>.

- Otra teoría más reciente es la de la higiene, que sostiene que el incremento de higiene y vacunación en las sociedades avanzadas, además de evitarnos enfermedades, está generando un efecto contraproducente en nuestra salud<sup>154</sup>. Así cuando esta patología infecciosa se da en la edad adulta, la falta de exposición a agentes infecciosos y por tanto ausencia de resistencia<sup>155</sup> provocaría que el SI respondiese de forma anómala, pudiendo desencadenar en algunos casos enfermedades autoinmunes como la EM.

#### 4.1. Los virus en la EM

Estos agentes infecciosos son considerados los responsables más plausibles de la EM debido a la presencia de altas concentraciones de IgG oligoclonal en el LCR y el SNC<sup>156</sup>. Uno de los primeros sucesos en la formación de las lesiones características de la EM es la muerte de los oligodendrocitos acompañada de activación glial<sup>14</sup>, lo que apoya la teoría vírica.

Un modelo animal empleado para el estudio de la EM (Encefalomielopatía mürida vírica de Theiler -TMEV-) es inducido por infección vírica. La resistencia a la infección viene determinada por las interacciones entre las Cds y el virus y el balance entre la persistencia de la infección y la respuesta inmune.

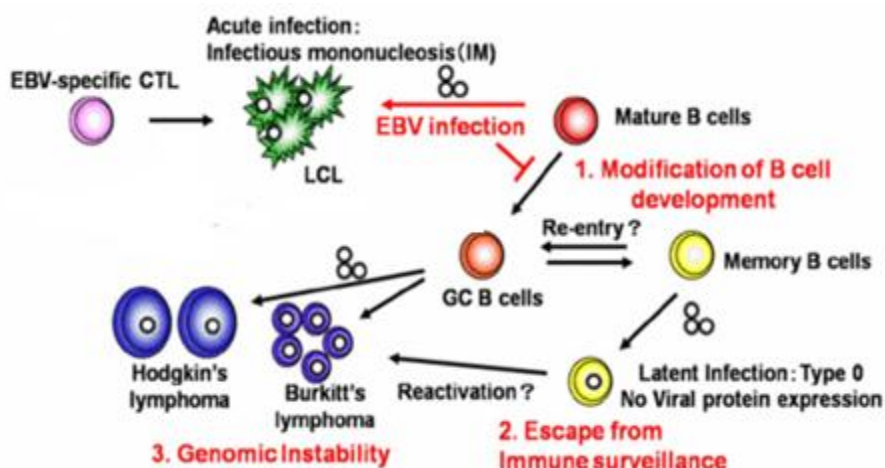
La hipótesis vírica fue sugerida hace más de 100 años y múltiples virus han sido barajados como candidatos (sarampión, paperas, varicela-zoster, virus Epstein-Barr,

parainfluenza, virus del moquillo canino). Algunos de los candidatos han sido descartados, pero otros han sido incluidos, como retrovirus endógenos, coronavirus y varios virus herpes humanos. Muchos artículos han demostrado y refutado cada uno de estos candidatos, pero la no detección del agente infeccioso (principalmente si es viral) no implica que no estuviera presente en un momento dado desencadenando una cascada autoinmune<sup>157</sup>.

Los virus que actualmente presentan mayor probabilidad de ser los implicados son los herpes virus en especial el virus Epstein-Barr (EBV) y el herpes virus humano 6 (HHV6), y retrovirus endógenos humanos asociados a EM (HERV).

#### 4.1.1. Virus Epstein-Barr en la EM

Es muy difícil demostrar la implicación de este virus debido a que está íntimamente ligado a la regulación del SI. No está claro si una respuesta o una regulación alterada frente a él es consecuencia del cambio del SI existente en la EM o si está involucrado en el desarrollo de la enfermedad, siendo el responsable de dicha respuesta modificada. La idea barajada en la actualidad es que en individuos con predisposición genética y con la contribución de otro factor ambiental<sup>158</sup> (incluyendo otros virus), la infección por EBV no puede ser controlada de forma efectiva, lo que da lugar a una expansión de LB (Fig. 6).



**Fig. 6.** Expansión LB inducida por Virus Epstein-Barr (EBV) y vulnerabilidad del SI<sup>159</sup>. LCL= línea celular linfoblástica, GC= centro germinal.

El 90% de los individuos sanos son seropositivos para EBV, pero en los pacientes con EM es casi el 100%<sup>160</sup>. Seropositividad (medida por titulación de Ac) que está ligada al haplotipo *HLA*<sup>161</sup>. Existe mayor titulación de Ac anti-EBV (EBNA1) en pacientes con EM que en

controles, y una relación entre la elevación de EBNA1 y el inicio de la enfermedad<sup>162</sup>. Parece que el incremento de la titulación de EBNA1 (antígeno dominante para CD4) ocurre entre 15 y 20 años antes del inicio de los síntomas y persiste en el tiempo<sup>163</sup>.

La presencia de EBNA1 en LCR y de LT EBV-específicos deja claro que existe una respuesta tanto humoral como celular a la presencia de EBV. Epítomos dominantes del EBV presentan mimetismo molecular con los epítomos para LT de mielina dominantes<sup>164-166</sup>. Las Treg en pacientes con EM neutralizan principalmente las células de memoria efectoras específicas para epítomos diferentes del que es dominante en individuos sanos (EBNA1), por lo que no prevendrían una respuesta cruzada de los LT efectores<sup>167</sup>. Existen LB infectados por EBV en los folículos germinales intrameningeos y la sustancia blanca de pacientes con EM<sup>168</sup>.

#### **4.1.2. Virus HHV6 en la EM**

Virus neurotrópico con capacidad de permanecer en estado latente en células del SNC y cuya infección puede provocar la muerte de oligodendrocitos<sup>169</sup>. La infección de Cds inmaduras por HHV6 induce alteraciones funcionales y fenotípicas en estas células por lo que podría afectar las funciones del SI<sup>170</sup>. Existen dos variantes de este virus, el HHV6-A y el HHV6-B, ambas presentes en los pacientes con EM, pero sólo se ha observado relación entre la EM y el HHV6-A que es la forma más neurotrópica del virus<sup>171</sup>.

La presencia de proteínas o genoma viral del HHV6 ha sido descrita en las lesiones del SNC<sup>172</sup>, oligodendrocitos, linfocitos y microglía de tejido dañado<sup>173</sup>. Existen diferencias significativas entre los niveles de DNA de HHV6 entre los pacientes RR y los PP<sup>174</sup>, sin embargo se puede encontrar HHV6 en individuos sanos y es frecuente su ausencia en muestras de pacientes con EM<sup>175</sup>.

A pesar de los resultados controvertidos respecto al HHV6 en la EM, su papel debe ser tenido en cuenta ya que muchos datos apuntan a su posible implicación en esta patología. No solo se ha descrito su presencia, sino los posibles mecanismos por los que pudiera estar incidiendo en el proceso de la EM<sup>176</sup>. Varios mecanismos son plausibles para la participación del HHV6 en la EM, uno de ellos es el mimetismo molecular<sup>177</sup>. El HHV6 presenta una secuencia idéntica a la MPB, proteína con alto potencial autoantigénico en la EM. Así, en los pacientes con EM se observa que más del 50% de los LT que reconocen MBP presentan



reacción cruzada con los residuos del 1 al 13 de HHV6<sup>178</sup>. Otro posible mecanismo es la síntesis por parte de este virus de una quimioquina específica del receptor CCR2 implicado en múltiples enfermedades inflamatorias crónicas<sup>179</sup>. Se expresa en monocitos y macrófagos infectados por virus, tiene capacidad de inducir quimiotaxis y está implicada en la transducción de señales.

Por otro lado, el receptor específico de HHV6, es el CD46 y los niveles del Ac antiCD46 son mayores en pacientes con EM que en controles<sup>180-182</sup>.

#### **4.1.3. Retrovirus endógenos humanos (HERV) asociados a la EM**

Estos virus, al estar integrados en nuestro genoma, pueden actuar tanto como genes de susceptibilidad como virus patógenos en la EM. En una de las regiones ligadas a susceptibilidad para EM (2q24-32) hay al menos dos HERVs<sup>183</sup>. Secuencias de estos virus han sido aisladas en plasma, LCR y suero de pacientes con EM<sup>184</sup>.

Existen tanto Ac reactivos como respuesta celular frente a epítomos HERV. Las proteínas codificadas por HERVs tienen efectos neuropatogénicos<sup>183</sup> y podrían tener propiedades inflamatorias.

Varios HERVs son activados durante el proceso inflamatorio de la EM<sup>185</sup> y esta activación puede ser producida por otros virus como HHV6<sup>186</sup>, virus herpes simple tipo 1 (HVS1) o el EBV<sup>183</sup>. Los retrovirus podrían provocar alteración de la respuesta inmunitaria por diversos mecanismos: activación de la transcripción de genes del SI, producción de neoantígenos al modificar componentes celulares, mimetismo molecular, diseminación de epítomos, activación del SI a través de receptores reconocedores de patrones y/o a través de la codificación de superantígenos endógenos evitando el proceso de restricción habitual de estimulación de LT a través del MHC<sup>187</sup>. Hechos que podrían armonizar la disparidad de hallazgos dentro del modelo infeccioso viral de la EM.

#### **4.2. Otros agentes infecciosos (bacterias)**

Dentro del amplio espectro de agentes infecciosos que representan las bacterias gram negativas presentan un interés dentro del estudio de la EM. Su implicación en la EM parte de la

presencia, en su pared, de lipopolisacáridos (LPS) (endotoxinas con gran capacidad antigénica). El LPS es inductor de respuesta inmune humoral y celular y es reconocido por los Toll-like receptors<sup>188</sup>, que son capaces de inducir expresión génica provocando la activación del SI a todos los niveles. Este producto bacteriano induce la expresión de CD40, molécula asociada a diversas enfermedades autoinmunes, entre ellas la EM, y tiene la capacidad de provocar TMEV en ratones resistentes genéticamente<sup>189</sup>.

De las múltiples bacterias gram negativas existentes, solo una parece mostrar relación con la EM, ésta es la “Clamidia pneumoniae”.

#### 4.2.1. “Clamidia pneumoniae”

Es una bacteria gram negativa intracelular obligada (infecta monocitos, pudiendo así alcanzar cualquier parte del organismo). Es un patógeno respiratorio muy prevalente en la población humana y responsable de infecciones crónicas. Los principales antígenos de membrana de esta bacteria son LPS y la proteína mayor de la membrana externa (MOMP). Se sabe que esta bacteria presenta tropismo por el tejido nervioso y su presencia ha sido demostrada en alteraciones crónicas del SNC como la Arteritis de la Temporal<sup>190</sup> y la enfermedad de Alzheimer<sup>191</sup>.

En 1998 se describió su presencia en el SNC de pacientes con progresión rápida de la EM, que mejoraron tras ser tratados con antibióticos<sup>192 193</sup>. Además, el genoma de Clamidia está presente en el 97% de los pacientes con EM frente al 18% de los controles<sup>193 194</sup>.

Por otro lado, la presencia de títulos elevados de Ac frente a ella, se ha asociado al paso de la forma RR a la SP<sup>195</sup> y su presencia es mayor en las formas progresivas de EM<sup>196 197</sup>.

La asociación entre “Clamidia pneumonie” y EM parece clara, aunque no así el papel concreto que desempeña en esta patología<sup>198</sup>.

## B. Farmacogenética

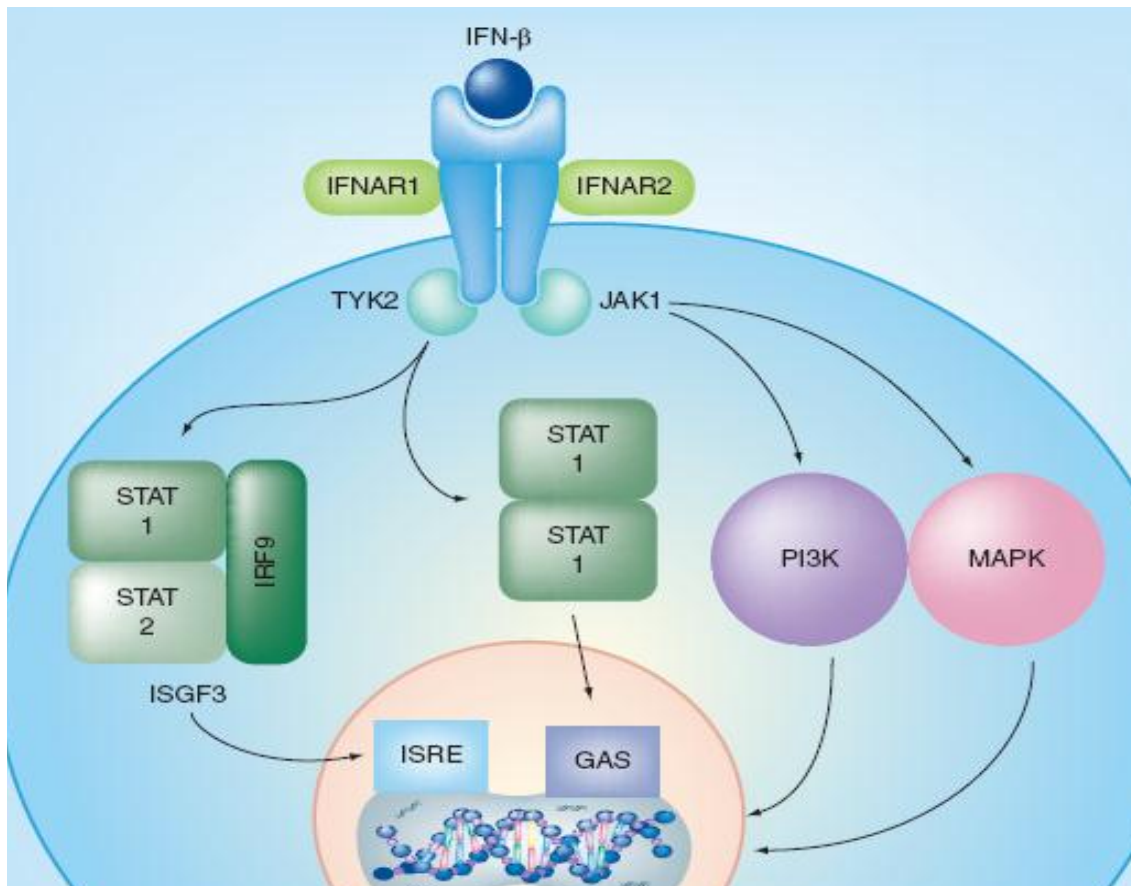
La EM es una enfermedad compleja en muchos de sus aspectos incluida la respuesta a tratamiento<sup>199</sup>. Se sabe que una parte de los pacientes responden al tratamiento (reducción de lesiones cerebrales<sup>200</sup> y de la clínica<sup>201</sup>) mientras que otros presentan empeoramiento clínico y progresión de la enfermedad a pesar del tratamiento.

Existen varios tratamientos crónicos para la EM (el tratamiento estándar para los brotes es la cortisona): el IFN $\beta$ , el Acetato de Glatimerato, la Azatioprina, la Mitoxantrona, Natalizumab (Ac monoclonales) y el Fingolimod; por ello, aplicar el tratamiento más adecuado para cada individuo se ha convertido en un objetivo primordial en la terapia frente a la EM.

El tratamiento más extendido es el IFN $\beta$ , con efectos demostrados en la forma RR de la EM<sup>202-204</sup>. Sin embargo, un elevado porcentaje de estos pacientes (20-55%) no responde a tratamiento<sup>205</sup> y se buscan marcadores biológicos que puedan predecir la respuesta a este tratamiento (tanto respuesta terapéutica como aparición de efectos adversos). De ahí que muchos de los estudios de farmacogenética y farmacogenómica en la EM se hayan centrado en este medicamento.

Entendemos por farmacogenética el estudio de la variación en genes relacionados con la respuesta a fármacos o la aparición de efectos adversos<sup>206</sup> y por farmacogenómica el estudio de las variaciones en el conjunto del genoma humano en el contexto de la respuesta a tratamiento<sup>207</sup>. Este término fue acuñado en 1959 por Vogel, haciendo referencia a la presencia de variaciones genéticas que condicionaban la respuesta a fármacos.

El IFN $\beta$  está implicado en múltiples procesos biológicos, siendo el más destacable dentro del contexto de la EM su acción en las rutas de señalización que modelan la expresión génica relacionada con la diferenciación de LT hacia Th1 y actividad antiviral<sup>208</sup> (Fig. 7). Cualquiera de los elementos de las rutas de señalización en las que participa el IFN $\beta$ , así como cualquiera de los genes cuya expresión induce, podrían estar implicados en la respuesta a este tratamiento<sup>209</sup>. Identificar los elementos implicados en la respuesta a IFN $\beta$  es crucial, por ello se han llevado a cabo distintas estrategias, como el genotipado de genes candidatos y estudios de genoma completo o estudios de expresión génica (transcriptómica).



**Fig.7.** Rutas de señalización de IFNβ.

El IFNβ se une a su receptor y activa la ruta de señalización JAK–STAT provocando la formación de complejos ISGF3 que migran al núcleo donde se unen a ISREs, localizados en el promotor de genes cuya transcripción es inducida por IFNβ, activando la transcripción. STAT puede unirse a otro elemento situado en la región promotora de los genes: GAS. Otra vía de señalización que pueden ser activadas por IFNβ son MAPK y PI3K. GAS=sitio de activación de IFN. ISRE: elemento de estimulación de respuesta por Interferón<sup>208</sup>.

Identificar estos elementos implicados en la respuesta a IFNβ es primordial para un mejor entendimiento del funcionamiento de esta terapia, así como para lograr el objetivo (ahora tan buscado) de una terapia individualizada. Hasta el momento se han publicado pocos estudios sobre la asociación genómica con la respuesta a IFNβ en la EM<sup>210-212</sup>, por ello nos proponemos estudiar si alguno de los genes seleccionados para este estudio pudieran estar implicados en el complejo mecanismo de respuesta al tratamiento de la EM.

## C. Genes estudiados

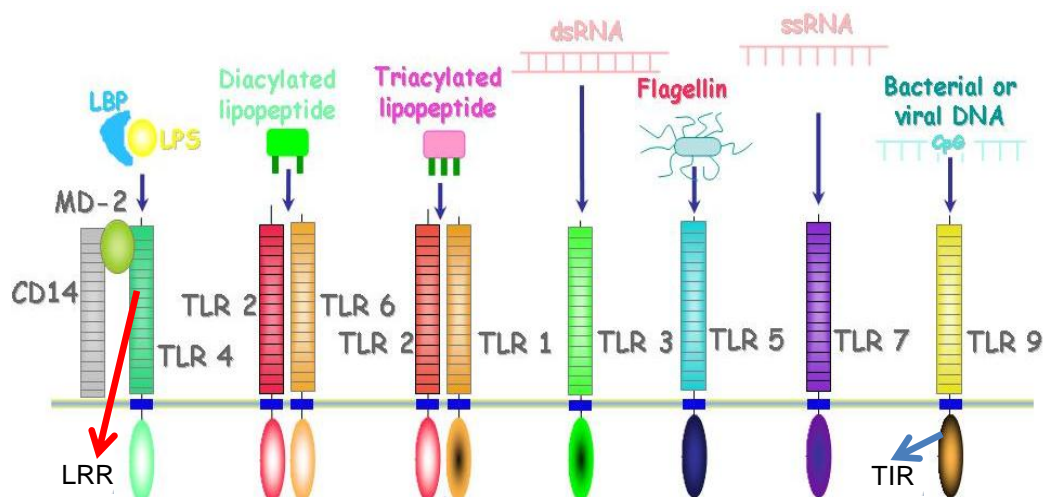
### 1. *TLR4*

El *Toll like receptor 4* (*TLR4*), OMIM: 603030, conocido también como *CD284* y *h Toll*, fue el primer TLR identificado en mamíferos. Está situado en la región 9q32-q33 entre las posiciones 120466610 y 120479149 (Datos del Ensembl) (Fig. 8).



**Fig. 8.** Posición del gen del *TLR4* dentro del cromosoma 9. (NCBI).

El *TLR4* pertenece a la familia de TLRs (Toll like receptors), denominados también receptores reconocedores de patrones (PRRs), que presentan una estructura conservada. El dominio extracelular se caracteriza por repeticiones ricas en leucina (LRRs), que son los principales responsables de la interacción del TLR con sus ligandos. El dominio intracelular presenta un dominio llamado receptor Toll/interleuquina 1 (TIR) (Fig. 9), que interactúa con la proteína de diferenciación mieloide de respuesta primaria 88 (MyD88), una proteína adaptadora que también presenta un dominio TIR. La activación de TIR desencadena una cascada de señalización que acaba con la liberación de citoquinas pro-inflamatorias.

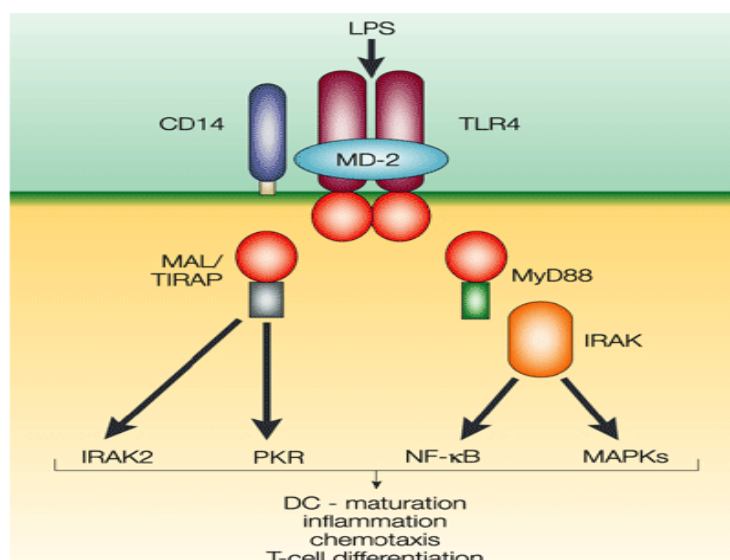


**Fig.9.** Receptores Toll.

Estructura general y patógenos reconocidos por ellos. TLR= Toll Like Receptor. LRR= repeticiones ricas en leucina. TIR= receptor Toll/interleuquina 1<sup>213</sup>.

Distintos estudios han demostrado que los TLRs reconocen patrones específicos de componentes microbianos y tienen la capacidad de regular tanto la inmunidad innata como adquirida<sup>214</sup>. En los últimos años algunos PRRs han sido asociados a distintas patologías autoinmunes, como la relación entre un polimorfismo funcional del promotor de DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) y la celiacía (CeD)<sup>215</sup>. Aunque están presentes en numerosos tejidos, su mayor tasa de transcripción se halla en los monocitos, cuya función se encuentra alterada en el contexto de la EM.

En 1998 se describió el papel del TLR4 en el reconocimiento de lipopolisacáridos (LPS), uno de los componentes mayoritarios de la pared de las bacterias Gram-negativas<sup>216-218</sup>. La activación de TLR4 por LPS se realiza a través de una proteína de unión a lipopolisacárido (LBP), proteína soluble sintetizada en el hígado y transportada al complejo receptor formado por CD14, TLR4 y MD-2<sup>219</sup> (Fig. 10). MD-2 está asociada a la porción extracelular, potencia la respuesta frente a LPS y parece jugar un importante papel en la distribución celular del TLR4. Las vías de señalización de TLR4 acaban en la síntesis y liberación de diversas citoquinas proinflamatorias (Fig. 10).



**Fig. 10.** Rutas de señalización del TLR4.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) unido a la proteína vinculante (LBP -Lipopolysacharide Binding Protein-) y al complejo receptor (formado por CD14, TLR4 y la molécula adaptadora MD2). El dominio TIR del TLR4 interacciona con MyD88 iniciando una cascada de señales que finaliza con la liberación de citoquinas pro-inflamatorias entre otras<sup>220</sup>.

El TLR4 presenta otros ligandos como el taxol (agente antimitótico)<sup>221</sup>, ligandos endógenos (proteínas de shock térmico implicadas en reacciones proinflamatorias en respuesta a infecciones crónicas por “*Chlamydia pneumoniae*”<sup>222 223</sup>), fibronectina<sup>224</sup>, ácido hialurónico<sup>225</sup> y virus (como el virus respiratorio sincitial<sup>226</sup> y retrovirus<sup>227</sup>).

## 2. MCP/CD46

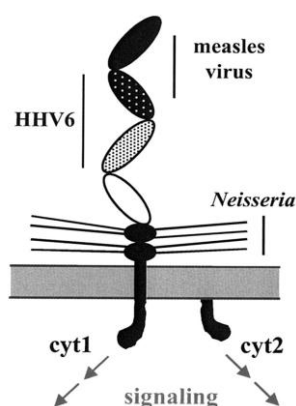
El *CD46*, OMIM: 120920, conocido también como *MCP* (siglas inglesas correspondientes a *Membrane Cofactor Protein*). Está situado en la región 1q32-q33 entre las posiciones 207925402 y 207968858 (Datos del Ensembl) (Fig. 11)



**Fig. 11.** Posición del gen del *CD46* dentro del cromosoma 1. (NCBI).

Este receptor transmembrana está ampliamente distribuido en células sanguíneas, plaquetas, células epiteliales y fibroblastos<sup>228</sup> y existe gran expresión del mismo en la BHE<sup>229</sup>. Forma parte de la familia de las proteínas reguladoras del complemento, siendo su función principal proteger a las células del ataque del complemento; se une al complejo C3b y actúa como cofactor de la proteasa 1 transformándolo en su forma inactiva (C3bi), pero también es el receptor de membrana para múltiples patógenos tanto bacterias como virus, entre ellos el HHV6 tipos A y B<sup>230</sup>.

Presenta una estructura que consiste en: 4 SCRs (Short Consensus Repeats) que unen el C3b y son los puntos de anclaje de distintos patógenos; de 1 a 3 dominios ricos en serinas/treoninas; 1 dominio transmembrana y 1 cola citoplasmática encargada de la transducción de señales (Fig.12).



**Fig. 12.** Estructura de *CD46*.

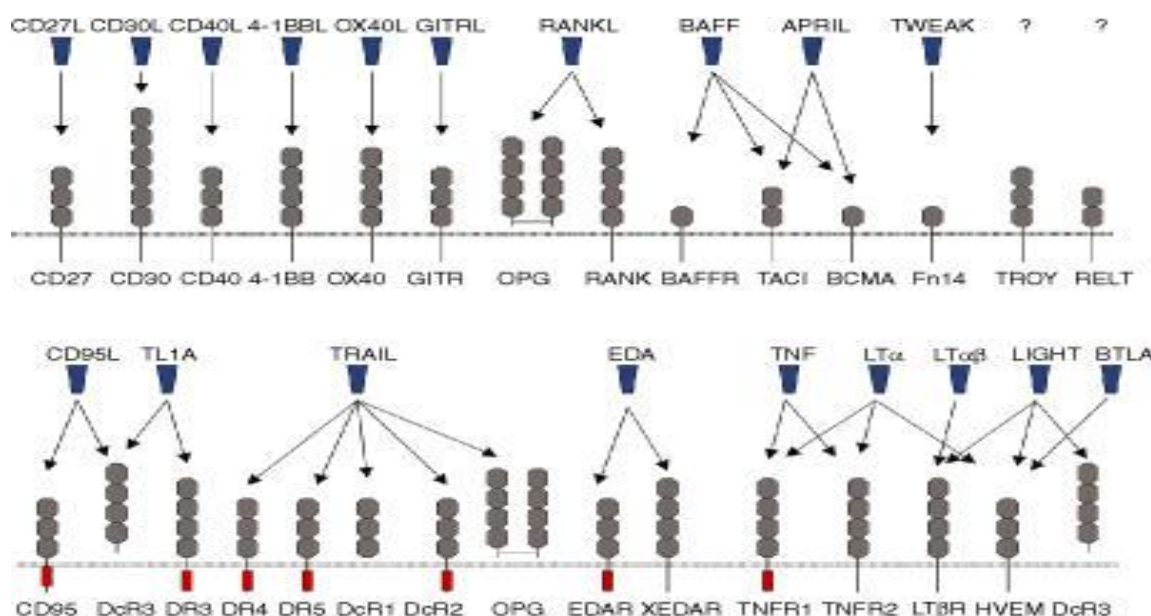
Dominios de interacción con patógenos (measles virus= virus paperas, HHV6= herpesvirus humano 6). Cyt1 y cyt2= colas citoplasmáticas de Transducción de señales<sup>230</sup>.

Sin embargo, el papel más destacado de este receptor es la regulación de la respuesta inmune, controlando la producción de citoquinas por parte de los LT<sup>231</sup>.



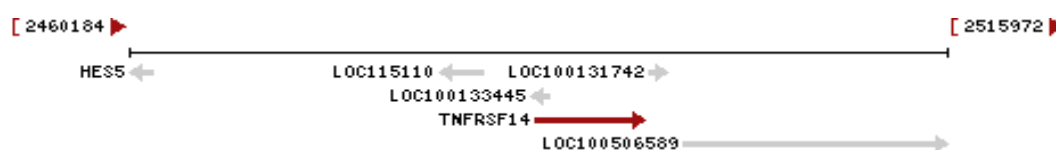
### 3. *TNFRSF14/HVEM/HVEA*

Este receptor es miembro de la Superfamilia de Receptores de Factores de Necrosis Tumoral (*TNFRSF*). Familia constituida por más de 20 miembros (Fig. 13), tiene una importante y reconocida función tanto en la respuesta a agentes infecciosos, en la apoptosis, como también en la inmunorregulación. Debido a la amplitud de la familia seleccionamos aquellos miembros con conocida función de receptor de agentes externos<sup>232 233</sup>. Además, miembros de esta familia tienen reconocida implicación en enfermedades autoinmunes por su acción coestimuladora que regula la respuesta de los LT y sin la cual la activación de éstos a través su receptor transmembrana sería subóptima y/o anérgica<sup>232</sup>.



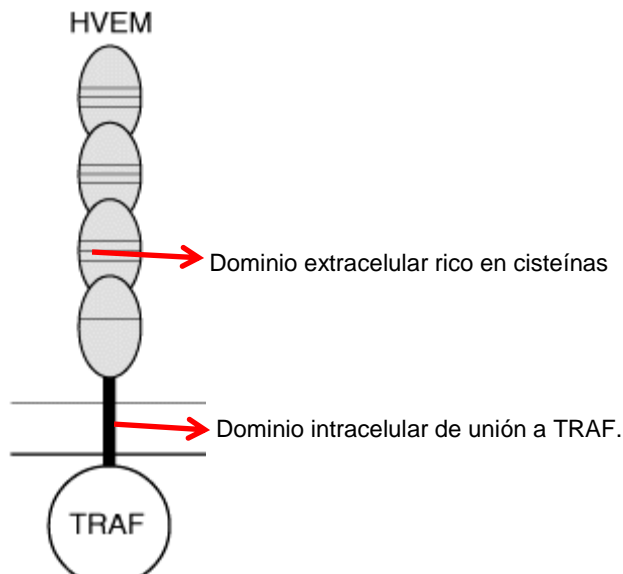
**Fig. 13.** Superfamilia de los Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (*TNFRSF*) y sus ligandos. Dominio extracelular en gris (repeticiones ricas en cisteína). Dominio intracelular de señalización a través de TRAF (Factor asociado a Receptor de TNF) en rojo<sup>232</sup>.

El *TNFRSF14* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 14*), OMIM: 602746, conocido también como *HVEM* (*Herpesvirus Entry Mediator*) y *HVEA* (*Herpesvirus Entry Mediator A*). Está situado en la región 1p36.32 entre las posiciones 2487078 y 2497061 (Datos del Ensembl) (Fig. 14).



**Fig. 14.** Posición del gen del *TNFRSF14* dentro del cromosoma 1. (NCBI).

Todas las moléculas de la TNFRSF presentan un dominio extracelular de estructura similar que consta de una serie de repeticiones ricas en cisteína (Fig. 13 y 15).



**Fig. 15.** Estructura de TNFRSF14.

TNFRSF14 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 14) o HVEM (Herpesvirus Entry Mediator)<sup>233</sup>. TRAF= TNF receptor associated factor.

Este receptor transmembrana presenta un dominio externo que une la envuelta glicoproteica D (gD) del virus Herpes Simple (HVS) formando parte del mecanismo de entrada del mismo<sup>234 235</sup>. Uno de los ligandos de TNFRSF14, LIGHT (ligand for herpesvirus entry mediator; tumor necrosis factor ligand superfamily member 14), compite con gD en su unión al receptor.

Aparte de su papel como receptor, desempeña una importante función de regulación como activador directo y/o coestimulador de LT, además de actuar de ligando de BTLA (Immunoglobuline superfamily members B and T lymphocyte attenuator)<sup>236 237</sup>. Se ha visto que su dominio citoplasmático se une a múltiples moléculas de la Superfamilia TRAF<sup>238</sup>. El hecho de que interaccione con esta familia de moléculas hace suponer que el HVEM esté involucrado en la mediación de señales que conducen a la activación de la respuesta inmune.

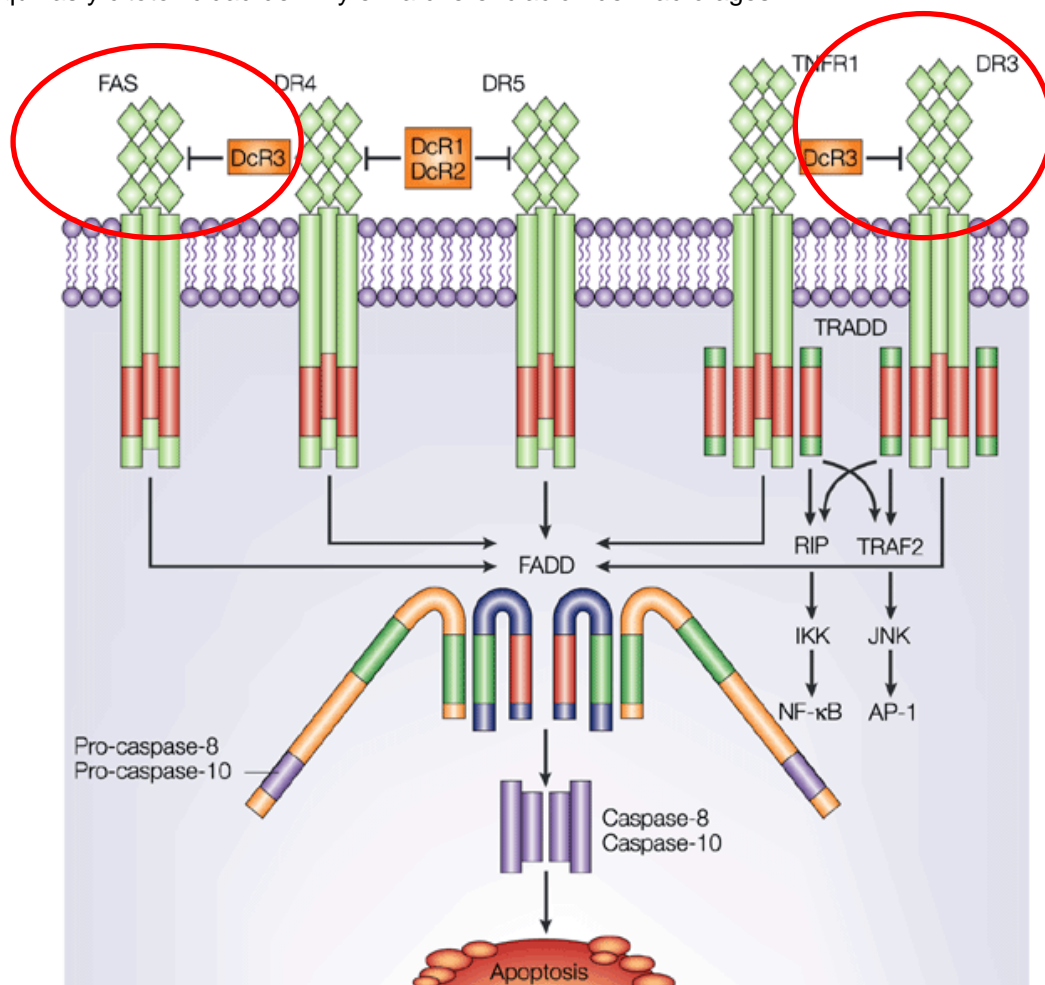
#### 4. TNFRSF6B/DcR3

El *TNFRSF6B* (*Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6B*), OMIM: 603361, conocido también como *DcR3* (*Decoy Receptor 3*). Está situado en la región 20q13.3 entre las posiciones 62289163 y 62330051 (Datos del Ensembl) (Fig. 16).



**Fig. 16.** Posición del gen del *TNFRSF6B* dentro del cromosoma 20. (NCBI).

Este miembro de la familia TNFRSF, es una proteína de secreción que ejerce efecto supresor sobre la muerte celular mediada por FasL (Fig. 17). Otros de sus ligandos conocidos son LIGHT<sup>239</sup> (que comparte con TNFRSF14) y TL1A<sup>240</sup> (ambos miembros de la familia TNFR). TNFRSF6 desempeña un papel coestimulador en la proliferación, diferenciación, producción de linfoquinas y citotoxicidad de LT y en la diferenciación de macrófagos<sup>241</sup>.



**Fig. 17.** Rutas apoptóticas de *DcR3* (*Decoy Receptor 3*). (Señaladas en rojo)<sup>242</sup>.



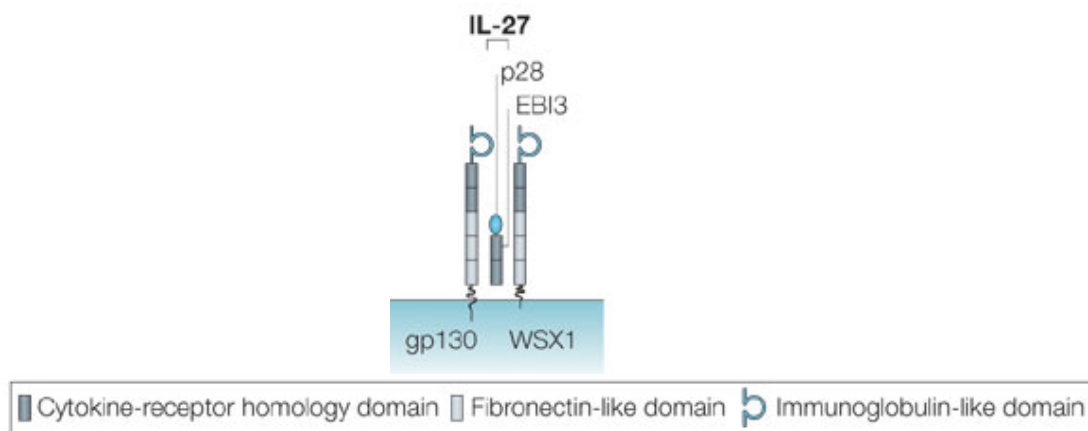
## 6. IL27

La IL27 (Interleuquina 27 o 28-KD Subunit IL27p28), OMIM: 608273. Está codificada en la región 16p11 entre las posiciones 28510683-28518155 (Datos del Ensembl) (Fig. 20).



**Fig. 20.** Posición del gen de la IL27 dentro del cromosoma 16. (NCBI).

Esta molécula es un heterodímero formado por la subunidad p28 de la IL30 (Interleuquina 30) y EBI3 (gen 3 inducido por el virus Eipstein-Barr) (Fig. 21), que es secretada por APCs y monocitos. A través de la unión a su receptor (receptor de citoquinas clase I - WSX1/TCRR-) induce una rápida expansión de LT CD4+ naïve y promueve la polarización hacia fenotipo Th1 mediante la producción de IFN $\gamma$  por CD4+ naïve, actuando sinérgicamente con IL12A.

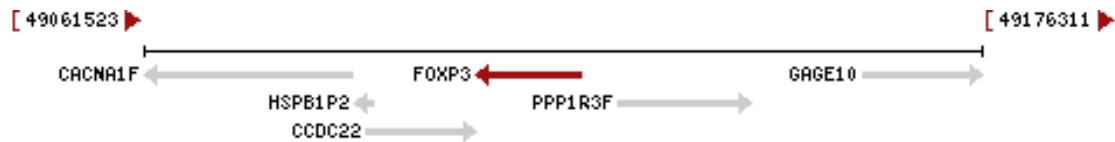


**Fig. 21.** Estructura de IL-27 (Interleuquina 27). Subunidad p28 de la IL-30 (Interleuquina 30) y EBI3 (gen 3 inducido por virus Eipstein-Barr)<sup>248</sup>.

IL-27 actúa contribuyendo al desarrollo de la repuesta inmune adaptativa, pero también activa la respuesta inmune innata<sup>249</sup>, ya que no solo cumple un importante papel en la función de LT, sino también sobre los LB (induciendo el cambio de isotipo). Ejerce así un mecanismo de control de la regulación en procesos autoinmunes e inflamatorios<sup>250</sup>.

## 7. *Foxp3/Scurfin/JM2*

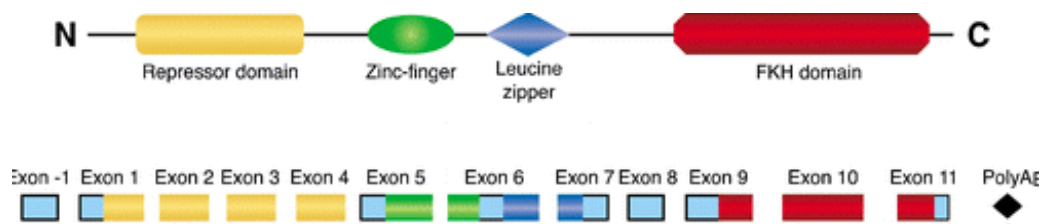
*Foxp3* (*Forkhead Box P3*, *SCURFIN*, *JM2*), OMIM: 300292. Está situado en la región Xp11.23-q.13.3 entre las posiciones 49106897-49121288 (Datos del Ensembl) (Fig. 22)



**Fig. 22.** Posición del gen de *Foxp3* dentro del cromosoma X. (NCBI).

Es miembro de la familia de genes reguladores de la transcripción “forkhead/winged-helix” (Fig. 23). Mutaciones en este gen producen graves alteraciones (poliendocrinopatía inmunodeficiente, enteropatía y síndrome de autoinmunidad-inmunodeficiencia, todos ellos de herencia ligada al cromosoma X).

Se ha definido como eje de la regulación de los Treg (CD4+/CD25+/FoxP3+) implicados en la supresión de respuestas inmunes inapropiadas (entre otros, prevención del desarrollo de enfermedades autoinmunes manteniendo la autotolerancia)<sup>251</sup>.



**Fig. 23.** Estructura proteica y génica de *Foxp3*<sup>252</sup>

*Foxp3* se expresa predominantemente en LT CD4+/CD25+, pero también en otros subconjuntos de LTCD4+. Así, la estimulación de LTCD4+ activados con TGFβ induce la expresión de *Foxp3* y la función supresora de estas células<sup>253</sup>.

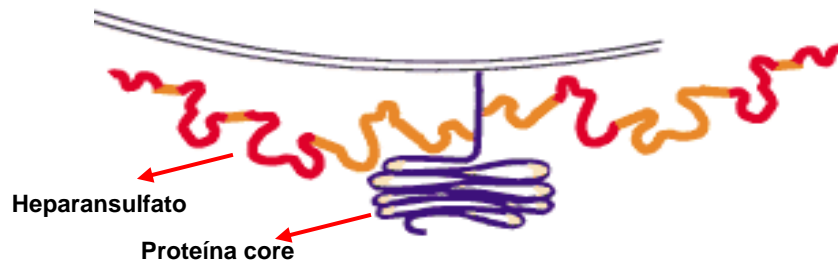
## 8. GPC5

GPC5 (*Glypican 5*), OMIM: 602446. Está situado en la región 13q32 entre las posiciones 92050929 y 93519490 (Datos del Ensembl) (Fig. 24).



**Fig. 24.** Posición del gen de GPC5 dentro del cromosoma 13. (NCBI).

Proteína de la superficie celular que presenta un número variable de proteoglicanos heparán-sulfato implicada en la regulación del crecimiento y división celular. Es miembro de la familia de los proteoglicanos heparán-sulfato, que están compuestos de una proteína core asociada a membrana y por un número variable de cadenas de heparan sulfato<sup>254</sup> (Fig. 25).

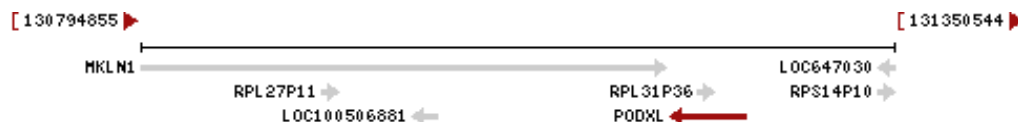


**Fig. 25.** Estructura proteica de los glipicanos (imagen modificada)<sup>254</sup>.



## 9. *PODXL*

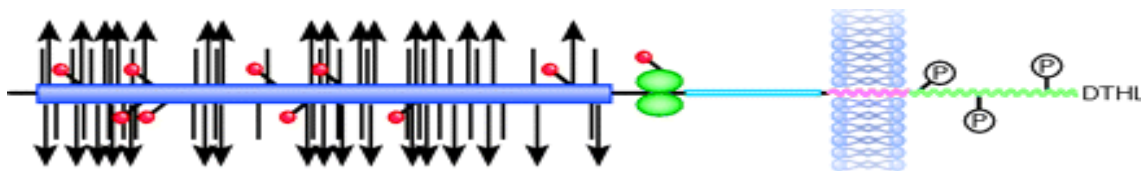
*PODXL* (*Podocalyxin-Like*, *Podocalyxin-Like Protein -PCLP-*, *Podocalyxin -PC-*), OMIM: 602632. Está situado en la región 7q32-q33 entre las posiciones 131185021 y 131242976 (Datos del NCBI) (Fig. 26).



**Fig. 26.** Posición del gen de la *PODXL* dentro del cromosoma 7. (NCBI).

Cabe destacar la alteración que existe en la EM en cuanto a la migración de células al SNC y el aumento de la permeabilidad de la BHE, que se piensa es debida al proceso inflamatorio que podría tener implicaciones en la etiopatogenia y cuyo control podría ser una diana terapéutica.

*PODXL* es una sialoglicoproteína ligada al citoesqueleto celular<sup>255</sup> (Fig. 27) de adhesión-antiadhesión, reconocimiento y migración celular, que constituye uno de los principales componentes del glicocalix de los podocitos renales. Sin embargo, ésta no es su única ubicación, ya que se expresa también en cerebro de ratones desde el periodo neonatal hasta la edad adulta<sup>256</sup>.



**Fig. 27.** Estructura de Podocalicina.

Dominio de mucina (azul claro) extracelular O-glicosilado (líneas verticales) y sializado (triángulos) con puntos de N-glicosilación (rojos) y que contiene un dominio globular contenedor de cisteína (verde), un tallo (azul) y un único dominio transmembrana (rosa) unido a un dominio intracelular (verde) con puntos de fosforilación, que termina en una secuencia DTHL (asparagina -D-, treonina -T-, histidina -H- y leucina -L-) en C-Terminal que interacciona con dominios PDZ<sup>257</sup> [dominio estructural que ayuda al anclaje de proteínas transmembrana, cuyas siglas inglesas corresponden a: post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) y zonula occludens-1 protein (zo-1)].

Se ha observado su capacidad de antiadhesión para mantener abiertos espacios entre los podocitos<sup>258</sup>, pero también su capacidad de actuar como molécula de adhesión (como ligando de L-Selectina) permitiendo la adhesión y rodamiento de los linfocitos<sup>259</sup>. De hecho, su sobreexpresión puede romper las uniones proteínicas y relocalizar las proteínas implicadas en esas uniones<sup>255</sup>.









## Objetivos

1- Estudiar los genes candidatos expuestos anteriormente, con el fin de identificar aquellos que jueguen un papel relevante en la predisposición a EM, poder esclarecer el papel del SI en esta enfermedad, averiguar si influyen en su fenotipo e identificar nuevas dianas terapéuticas.

A- Analizar si alguno de los genes estudiados interaccionan con el principal factor genético de susceptibilidad conocido: *HLA DRB1\*15:01*.

B- Comprobar si la variabilidad genética de alguno de estos genes inmunológicos condiciona la forma clínica (RR y no RR) de los pacientes con EM.

C- Buscar una relación entre estos genes y el agente infeccioso HHV6 en los pacientes con EM.

D- Verificar si alguno de ellos determina una edad de debut anterior a la habitual.

E- Estudiar la implicación de los genes analizados en la progresión (lenta o rápida, PL y PR) de la enfermedad.

2- Establecer si estos genes están relacionados con la efectividad de la terapia con IFN $\beta$ , ya sea por su implicación directa en la naturaleza heterogénea de los mecanismos inmunes de los que depende la EM o por su implicación en el mecanismo farmacológico del IFN $\beta$ , con el fin de predecir aquellos pacientes que realmente se puedan beneficiar de este tratamiento y aproximarnos al objetivo de la terapia individualizada.







# Materiales y Métodos

El estudio se ha llevado a cabo en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC). Los individuos seleccionados para el estudio son de origen caucásico y pertenecientes a la Comunidad de Madrid.

Para el genotipado de *TNFRSF14* y *TNFRSF6B* se empleó una cohorte ampliada de 1370 pacientes y 1715 controles en las que se incluyen las cohortes de: el Hospital Clínico San Carlos (Madrid), el Hospital Virgen de las Nieves/ Hospital Clínico San Cecilio/ Banco de Sangre (Granada), el Hospital Carlos Haya (Málaga) y Hospital Virgen Macarena (Sevilla).

## A. Muestras

### 1. Casos

#### **Cohorte del Hospital Clínico San Carlos (Madrid).**

Se realiza el estudio en enfermos de EM diagnosticados en la Unidad de Esclerosis Múltiple del Servicio de Neurología del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) siguiendo los criterios de Poser<sup>260</sup>, previa obtención del consentimiento informado. A lo largo del estudio se fueron incorporando nuevos pacientes, siendo el número inicial de 362 y de 591 al final del estudio.

Los pacientes fueron clasificados (sin que existieran diferencias significativas en la clasificación entre el inicio y el final del trabajo) por:

- **Alelo de susceptibilidad HLA:** se agruparon los pacientes según su estatus de portadores o no del alelo *HLA DRB1\*15:01* (Tabla 1).



- **Formas clínicas:** disponemos de este dato para 339 enfermos al inicio y de 555 al final del estudio. De ellos, 8,55% al inicio y 9,19% al fin presentan la forma PP; 79,35% al inicio y 81,8% al fin presentan la forma RR; 10,91% al inicio y 8,1% al fin presentan la forma SP, y 1,18% al inicio y 0,9% al fin presentan la forma PR. Para el análisis estadístico se dividieron los pacientes en dos grupos, los que presentaban la forma PP y los que no (No PP), dentro de los No PP se incluyeron los pacientes con las formas RR y SP (los pacientes con la forma PR no se incluyeron en el estudio debido a su baja frecuencia en nuestra población analizada)
- **Edad de debut:** la edad media de los pacientes al diagnóstico es de  $29 \pm 8,6$  años al inicio y de  $29,9 \pm 8,8$  al fin del estudio. Contamos con 409 pacientes con edad de debut conocida y se distinguen 3 grupos de pacientes en función de la edad de inicio de la EM, aquellos que debutan antes de los 18 años (EM pediátrica), N= 20 (4,9%), entre los 18 y los 50 años (EM Clásica), N= 378 (92,4%) y los que debutan después de los 50 años (EM de inicio tardío), N=11 (2,7%). El tercer grupo no se incluyó en el estudio de estratificación por edad, dada su baja frecuencia en nuestra población de estudio. Esta subdivisión por edad de debut se ha realizado en base a estudios epidemiológicos que muestran que el 2,5-5% debutan antes de los 18 años (con edad media de presentación de 13 años). Los estudios de población y series de casos control muestran que entre 2,5 al 5% de la población con EM son menores de 17 años<sup>261 262</sup> y que entorno al 4,7% ocurre después de los 50 años<sup>263 264</sup>.
- **HHV6:** Se dispone de información de 189 pacientes respecto a su estado de portador N=55 (29%) o no N=134 (71%) de HHV6 (al final del estudio).
- **Sexo:** se dispone de la información correspondiente a 348 pacientes al inicio del estudio y de 577 al final del mismo (los enfermos de los que no disponemos de datos de género son anónimos). La distribución es la esperada para la enfermedad un 65% de mujeres y un 35% de hombres (mujeres: 64,9% al inicio y 63,9% al fin, hombres: 35,1% al inicio y 36,1% al fin).
- **Respuesta a tratamiento:** disponemos de 199 pacientes tratados con IFN $\beta$  durante al menos 2 años y con al menos 2 brotes en los 2 años previos al tratamiento (al final del estudio). Se clasificaron en: respondedores, aquellos que no presentaban ningún brote

ni incremento en la escala EDSS en 2 años de tratamiento (N=67, 34%), y no respondedores, aquellos que tuvieron al menos 2 brotes o un aumento de EDSS  $\geq 1$  punto (N=92, 66%), en el mismo periodo. El resto fueron considerados como indefinidos (no se incluyeron en el análisis estadístico).

Tabla 1. Características Clínicas de los pacientes de EM incluidos en el estudio

EM N=362→591	N inicial	N final	%
<b>Forma clínica</b>	<b>339</b>	<b>555</b>	
PP	29	51	8,5 - 9,2
No PP	310	504	91,5 - 90,8
<b>Género</b>	<b>348</b>	<b>577</b>	
Masculino	122	208	35,1 - 36,1
Femenino	226	369	64,9 - 63,9
<b>DRB1*15:01</b>	<b>358</b>	<b>574</b>	
15:01+	136	201	38 - 35
15:01-	222	373	62 - 65

PP=Primario Progresivo, 15:01+: portador del alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01-: no portador del alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01*. EM: Esclerosis Múltiple.

## 2. Controles

### Cohorte del Hospital Clínico San Carlos (Madrid).

Comenzamos el estudio con 467 individuos y se finalizó con 865; todos individuos caucásicos españoles sin antecedentes de enfermedades autoinmunes en familiares en primer grado, no emparentados entre sí y obtenidos principalmente de donantes de sangre y personal investigador. Este grupo está ajustado a los casos por etnia, pero no por sexo ni edad. La distribución por género de los controles al inicio del estudio (N=443) es de 246 (56,5%) mujeres y 197 (44,5%) hombres, al final (N=808) del estudio es de 422 (52,2%) mujeres y 386 (47,8%) hombres. No existen diferencias significativas en la distribución por sexos en los controles al principio y al final del estudio ( $p=0,26$ ). Disponemos del dato de edad para 218 controles al inicio del estudio con una edad media de  $30,5 \pm 10,4$ ; y para 433 controles al final del estudio con una edad media de  $38,8 \pm 12,9$ .

## B. Materiales

### 1. Material instrumental

#### 1.1. Material general de laboratorio

Agitadores (magnético -Selecta Agimatic -S-, vórtex -2 Genie).

Balanza de precisión (Precisa 600 C -Zurich-).

Baños (Selecta Unitronic 320 OR e Innova 3000).

Bomba de Vacío (Laboport, KNF).

Caja de exposición y películas de autorradiografía (pantalla intensificadora X-OMATIC REGULAR Kodak, películas AGFA).

Centrífugas (microfuga Sigma 201 M, microfuga Hettich Mikroliter, centrífuga Kubota 5800).

Equipos de electroforesis (cubetas horizontales: Mupid-2, Cosmo BIO CO., Ltd, fuente de alimentación Bio-Rad Power-Pac 300).

Equipo fotográfico (Gelprinter TDI).

Espectrómetro (Pharmacia GeneQuant, LKB Biochrom –England-).

Fungibles (tubos de 200 µl de MicroAmp, Applied Biosystems y Abgene House; tubos de 500 µl Applied Biosystems, modelo GeneAmp; puntas de D10 y D200 Wilson y Microtube Rack system Greiner).

Horno de hibridación (modelo Ecogen).

Pipetas automáticas (modelos p-10, p-20, p-200, p-1000 y p-5000 Gilson -Francia-).

Revelador de autorradiografía, (RPX-OMAT PROCESSOR MODEL M6B, Kodak).

Soporte de membranas (Bio-Rad).

Termocicladores (Modelo PTC-100, MJ Research.Inc y modelo GENEAMP PCR System 2400, Applied Biosystems).

Transiluminador (Cross-linker modelo FLUO-LINK).

## **1.2. Material específico**

Secuenciador automático: ABI PRISM 3100 GENETIC ANALYZER Applied Biosystems.

PCR a tiempo real: 7900 HT Fast Real-Time PCR system de Applied Biosystems.

Sistemas informáticos: Programas informáticos.

Análisis estadístico: Epi-info, v5.01 C.D.C. (Centers for disease control and prevention), USA y SPSS versión 13.0 Standard. SPSS Inc., USA.

Base de Datos: Microsoft Access 2003.

Editor de textos: Microsoft Word 2003.

Software de análisis de fragmentos: ABI PRISM 3100 Collection, 3100 GENESCAN 3.1 y GENEMAPPER v3.0.

Software del 7900 HT: SDS 2.2.1 (Sequence Detector System software).

Análisis "in silico": SNPper. (búsqueda de SNPs candidatos), Hapmap/Haploview 4.0 software (<http://www.hapmap.org/>) (cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg en SNPs), Pedstats 0.6.12 Software (cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg en microsatélites). Arlequín 2.000 software (cálculo de frecuencias haplotípicas y de desequilibrio de ligamiento -D' y R<sup>2</sup>-).

## **2. Reactivos**

Agarosa al 1,5% (en disolución de TBE 1x con bromuro de etidio -1 µg/mL-).

Agua destilada inyectable Fresenius (1000 mL).

Anticuerpos (fragmentos Fab específicos para digoxenina unidos covalentemente a fosfatasa alcalina -Boehringer Mannheim-).

BufferB (500mL: 12,5mL de 0,075M NaCl -3M- y 25mL de 0,024M EDTA -pH=8, 0,5M).

Buffer O 2x (1L: 200mL ácido maleico 1M, 600mL H<sub>2</sub>O. pH ajustado a 7,4. Se añaden 100mL de NaCl 3M. Llevar a 1L.).

Buffer1 (1L: 1L de buffer O 2x y 3 mL de Tween).

Buffer3 (1L: 100 mL de Tris-HCl 1M a pH 9,5, 33 mL NaCl 3M y 50 mL  $MgCl_2$  1M).

Productos químicos de rutina suministrados por Merk y Sigma.

Oligonucleótidos sintetizados automáticamente por Applied Biosystems.

Sondas marcadas en 5' con digoxigenina (kit de Boehringer Mannheim).

Reactivo Denhardt 50x (100mL: 1g Ficoll 400, 1g PVP, 1g BSA y agua hasta 100mL).

Reactivo de prehibridación (20mL: 4mL SSPE 15x, 2mL reactivo Denhardt 50x, 200 $\mu$ L N-lauril, 20 $\mu$ L SDS 20x y agua hasta 20 mL).

Solución blocking (reactivo de Roche: 25g del blocking en 250mL de buffer O 2x).

SSC 20x (1L: 175g NaCl, 88g citrato sódico; ajustar a pH 7 con NaOH 0,2 N).

SSPE 30x (500mL: 130g NaCl, 23g fosfato sódico y 1g EDTA puro).

STMT (1L: 320mL Sacarosa 0,32M (1M), 1mL Tris-HCl 1M -pH 7.5-, 1mL  $MgCl_2$  5mM - 1M- y 10mL Tritón X-100 1%).

Sustrato CSPD® (Boehringer-Mannheim. Preparación: disolución de 100 $\mu$ L de CSPD en 10mL de buffer3).

TBE 10x (1L: 108g Tris-base, 55g ácido bórico, 20mL EDTA 0,5M pH 8 y el resto agua).

TMAC (1L: 50mL Tris-HCl 1M a pH 7,5, 4mL EDTA 0,5M a pH 7,5 y 5mL SDS 20x).

Tris-HCl 0,5M y NaCl 3M (pH 7,4): para 1000mL se emplean 61g de Tris-base, 175g de NaCl y 35mL de HCl 37%.

## C. Métodos

### 1. Obtención del ADN a partir de sangre periférica

EL ADN se obtiene de células nucleadas presentes en sangre periférica (leucocitos), obtenidos a partir de una muestra de 10cc de sangre periférica extraída a los pacientes<sup>265</sup>.

Aislamiento del ADN:

- Lisado de hematíes: sangre en EDTA a la que se añade STMT (proporción 3:1). Centrifugar y decantar el sobrenadante. Resuspender el pellet en STMT y volver a centrifugar (repetir hasta que el pellet quede limpio). Resuspender el pellet en BufferB.
- Rotura de proteínas asociadas al ADN: añadir 325µL de agua, 50µL de proteinasa K y 125µL de SDS (20%) e incubar a 37°C, en baño de agitación constante.
- Precipitación de péptidos: añadir 2mL de NaCl 6M y mezclar. Centrifugar y recoger el sobrenadante, añadir isopropanol (proporción 1:1), mezclar hasta que se forme una “medusa” compacta. Se recoge la medusa y se mezcla con 1mL de etanol al 70%.
- Se seca el ADN y se resuspende en 600µL de buffer Tris-EDTA (TE). Conservar a 4°C.

#### 1.1. Calidad y rendimiento de la extracción de ADN

Se valora por espectrofotometría; se mide la absorbancia a 260nm de una alícuota del ADN extraído. Estimación de la pureza con el cociente (ratio) entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280nm; se acepta una ratio comprendida entre 1,7 y 1,8.

Se cuantifica el ADN sobre la base de que una unidad de D.O. equivale a 50 ng/µL de ADN.

En base a los datos de pureza y a la cuantificación, se realiza una dilución con agua destilada para obtener una concentración de trabajo de ADN de 10 ng/µL.

## 2. Estudio de los genes de Clase II **DRB1**, **DQA1** Y **DQB1**

Para el estudio de los loci de clase II **DRB1**, **DQA1** y **DQB1** empleamos la técnica PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotid Probe*):

- Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del segundo exón de cada uno de estos genes por ser en ellos donde se concentran los polimorfismos que distinguen alelos<sup>266</sup>.
- Transferencia del producto amplificado, en condiciones de desnaturalización, a una membrana de nylon mediante la técnica de Dot-Blot<sup>266</sup>.
- Hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas de alelo presente en la muestra (para caracterizar los alelos de cada uno de los pacientes estudiados).
- Revelado en placa fotográfica (por quimioluminiscencia)
- Interpretación de los resultados.

## 3. Estudio de los alelos del gen **HLA-DR2**

Clásicamente, la nomenclatura serológica diferencia dentro del gen de clase II **DRB1** diferentes alelos o variantes que van desde **DR1** hasta **DR10**<sup>266</sup>. Dentro del alelo **DR2**, alelo asociado a la EM, existen a su vez cuatro subtipos en nuestra población: **DRB1\*15:01**, **DRB1\*15:02**, **DRB1\*16:01** y **DRB1\*16:02**. El estudio molecular del alelo **DRB1\*15:01** se ha realizado, así mismo, utilizando sondas Taqman®<sup>267</sup>.

## D. Estudio de los polimorfismos

El estudio de los diferentes genes seleccionados se ha realizado analizando los diferentes SNPs. En el estudio del *Foxp3* empleamos también un microsatélite. Para su elección consultamos [www.snpper.chip.org/bio/snpper](http://www.snpper.chip.org/bio/snpper), donde aparecen todas las variaciones puntuales que hay descritas en los genes seleccionados (Tabla 2).

Tabla 2. Código rs y código de Applied-Biosystems, posición en el gen (codificación HapMap) y cambio de nucleótido (HapMap) de los polimorfismos estudiados en los distintos genes.

Código rs	Posición	Cambio nucleotídico	Código Applied-biosystems	alelo minoritario (caucásicos)	Cambio observado **
<b>TLR4</b>					
rs2737191	Cr9:119502536	c.-4037A>G	C__1844485_10	29%	Promotor
rs10818073	Cr9:119507397	c.825C>T	C__31784002_20	3%	intrónico
rs11536869	Cr9:119509653	c.3081A>G	C__31784006_10	5%	intrónico
rs1927911	Cr9:119509875	c.3303A>G	C__11722141_10	27%	intrónico
rs12377632	Cr9:119512551	c.5979C>T	C__31784020_10	39%	intrónico
rs1927907	Cr9:119512585	c.6013C>T	C__11722137_10	13%	intrónico
rs2770146	Cr9:119513159	c.6587T>C	C__16284840_10	36%	intrónico
rs5030717	Cr9:119513655	c.7093A>G	C__31784023_10	6%	intrónico
rs1554973	Cr9:119520633	C>T	C__2704053_10	23%	intergénico
<b>CD46</b>					
rs2796267	Cr1:205991529	c.653A>G	Diseño a medida	36%	Promotor
rs2724385	Cr1:205998151	c.5971A>T	C__26970976_10	49%	intrónico
rs2796269	Cr1:206003509	c.11328T>C	C__26970968_10	38%	intrónico
rs6657476	Cr1:206026727	c.34546G>T	C__29297885_10	19%	intrónico
rs859706	Cr1:206028893	c.36712A>G	C__2784724_10	45%	intrónico
<b>TNFRSF14</b>					
rs6684865	Cr1: 2536089	c.14667A>G	C__30497685_10	32%	5'ÚTR
<b>TNFRSF6B</b>					
rs4809330	Cr20:61820030	c.9653G>A	C__26545002_10	33%	Intrónico
<b>CD40</b>					
rs1883832	Cr20:44180389	c.-2C>T	C__11655919_20	24%	Intrónico
<b>IL27</b>					
rs9550642	Cr13:19848092	A>G	C__32227369_10	9%	intergénico
<b>Foxp3</b>					
rs2294020	CrX:48990168	G>A	C__25752550_10	31%	intergénico
rs2280883	CrX:48996072	c.5834T>C	C__15874601_20	41%	Intrónico
rs4824747	CrX:49015967	c.-14062G>T	C__2766059_10	15%	promotor
<b>GPC5</b>					
rs10492503	Cr13:91683090	c.833796A>T	C__3157146_10	10%	Intrónico
rs1411751	Cr13:91695506	c.846207C>T	C__746543_10	3%	Intrónico
rs9523554	Cr13:91700020	c.850724C>T	C__2955812_10	17%	Intrónico



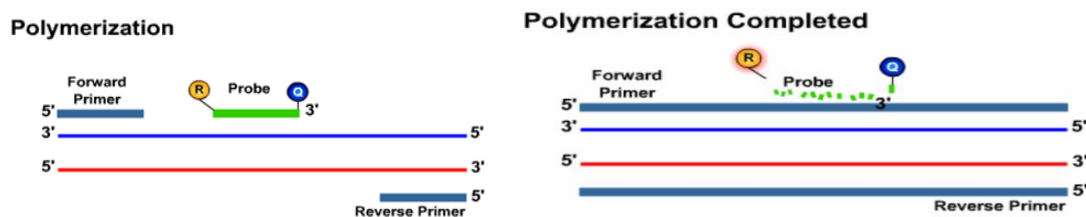
**PODXL**

<b>rs1477226</b>	Vr7:131105904	T/C	C___7615571_10	5%	Intergénico
------------------	---------------	-----	----------------	----	-------------

En los cambios de nucleótido, el que aparece en segundo lugar es el menos frecuente. Cr: Cromosoma.

\*Datos obtenidos a partir de población caucásica sana. Fuentes: HapMap y Ensembl. \*\* Ninguno de los SNPs analizados provoca un cambio a nivel proteico.

El procedimiento seguido para el genotipado de las muestras es similar al utilizado en el caso del análisis del locus *HLA-DR2*, mediante sondas TaqMan, siguiendo las condiciones recomendadas por Applied Biosystems (Fig. 28). Este método está basado en una PCR, que amplifica el fragmento de interés, a la que se añaden dos sondas específicas de alelo que hibrida dicho fragmento. Estas sondas presentan marcadores fluorescentes en el extremo 5' [FAM ( $\lambda=530\text{nm}$ ) o VIC ( $\lambda=560\text{nm}$ )], mientras que en el extremo opuesto lleva un *quencher* o molécula "secuestradora" (TAMRA). La presencia de las dos moléculas en la misma sonda da lugar al fenómeno de transferencia de energía por resonancia, la luz emite a baja longitud de onda y es absorbida por la molécula secuestradora, a diferencia de la que emitirá el marcador fluorescente en caso de liberarse por la actividad 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. Los cebadores aquí empleados son no específicos de alelo, se unen por complementariedad. La Taq elonga el fragmento y cuando la elongación llega al punto de unión de la sonda, la enzima degrada la sonda, gracias a su actividad exonucleasa 5'→3', liberando así al fluorocromo de la actividad secuestradora del *quencher*, de esta manera se hace detectable la luz emitida por el fluorocromo (Fig. 28). Según la luz emitida se determina si la muestra es homocigota (señal única FAM o VIC) o heterocigoto (ambas señales -FAM y VIC-)

**Fig. 28.** Tecnología Taqman®. Applied Biosystems©.

## E. Tipado del microsatélite de *Foxp3*

El genotipado del microsatélite (GT)<sub>n</sub> (Tabla 3) situado en el intrón 0 del gen *Foxp3* (previo al exón 1) se realizó mediante PCR (previamente detallada) utilizando los siguientes primers: Forward 5'-CAACCATTGCCCTCATAGAGG-3' (que está marcado con fluorescencia 6-FAM en 5'), y Reverse 5'-GGCGGTATGAGATACTCGACCA-3'. Tras la amplificación por PCR de las regiones que rodean los microsatélites, el ADN amplificado de cada una de las muestras se diluye 1/2-1/10 en agua destilada según sea necesario. A 1 µL del amplificado diluido se añaden 10 µL de formamida desionizada (Sigma), que actúa como agente desnaturizante del ADN y 0,4 µL de marcador 400HD GeneScan-Rox (Applied Biosystems, Washington, USA), como patrón interno de tamaño dentro de cada muestra. Las muestras así preparadas se desnaturalizan en un termociclador durante 3 min a 94°C con un enfriamiento rápido a 4°C para evitar que se renaturalicen las muestras de ADN.

En el secuenciador automático (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer -Applied Biosystems, Foster City, CA, USA-) se separan los tamaños de los fragmentos de ADN mediante electroforesis capilar con el polímero POP-4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El tamaño de los fragmentos se estima a partir del marcador interno de peso molecular aplicando el método Local Southern y su análisis mediante el Software GeneMapper versión 3.7 -Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabla 3. Microsatélite *Foxp3*

Código	Posición	Repetición
Microsatélite DXS573	Intrón 0	(GT) <sub>n</sub>

## **F. Análisis de la presencia de HHV6**

Se separó el suero de muestras de sangre de los pacientes EM y se analizó la presencia de HHV6 en los meses 6, 12, 18 y 24 de seguimiento.

La extracción de ADN vírico se realizó según las instrucciones de la casa comercial para 1mL de suero eluido en 50µL de agua libre de nucleasas (DNA spin column of QIAamp Ultrasens Virus Kit, QIAGEN, Hilden, Germany).

Para determinar la presencia de ambas variantes de HHV6 (A y B) mediante qRT-PCR se empleó la técnica descrita por Hymas<sup>268</sup>. Cada muestra se analizó por duplicado y con un control negativo (mezcla de todos los reactivos sin ADN) por cada 5 muestras. Se trazó el logaritmo de la señal normalizado en base a una referencia interna ( $\Delta Rn$ ) y se estableció el ciclo umbral -Cu- (número de ciclos de la PCR en el que la intensidad de fluorescencia supera un umbral arbitrario en la fase exponencial de la amplificación) cuando  $\Delta Rn$  igualaba las 10 desviaciones Standard respecto de la línea de base. El número de copias de DNA se calculó interpolando el valor para cada muestra en una curva de cantidades conocidas (5, 50, 500 y 5000 copias) de ADN aislado de viriones HHV6-B (Z-29) (Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD). En este estudio sólo se han empleado para el análisis estadístico las muestras positivas para el subtipo A de HHV6, que es el específico de EM<sup>171</sup>.

También se analizó la presencia de replicación activa de HHV6-A en aproximadamente 400 controles sin que hubiese ningún caso positivo.

## G. Estudio de la respuesta al tratamiento

Para establecer si un paciente responde o no al tratamiento se emplearon dos parámetros clínicos.

- **Brote:** se define como la aparición de síntomas nuevos o disfunción neurológica, de duración superior a 24 horas, o el deterioro significativo de síntomas preexistentes que se habían estabilizado o permanecido ausentes durante 30 días.
- **Escala EDSS (Expanded Disability Status Scale):** Diseñada y ampliada por Kurtzke<sup>269</sup>, consiste en una escala numérica del 0 (normal) al 10 (muerte), con incrementos de 0,5 en 0,5 en base a la presencia o ausencia de alteraciones en 8 sistemas funcionales neurológicos (piramidal, cerebelar, tronco cerebral, cerebral, sensorial, intestinal, vesical y visual).

## H. Análisis de datos

Los datos recogidos se transfirieron a una base de datos Microsoft Access 2003®. Los recuentos se establecieron mediante consultas en dicho programa, y los resultados obtenidos de los estudios genéticos se analizaron con los siguientes métodos:

### 1. Estudio caso-control

Con el estudio de caso-control, de gran sensibilidad, podemos detectar asociaciones de baja magnitud. Sin embargo, un resultado positivo en este tipo de análisis no implica de forma absoluta siempre la existencia de ligamiento entre el marcador dado y la enfermedad. Ya que, cuando la población está estructurada puede no existir concordancia étnica plena de casos y controles dando lugar a falsos positivos e incluso, en algún caso, a falsos negativos.

Las comparaciones caso-control se llevaron a cabo mediante tablas de contingencia 3x2 para comparaciones de frecuencias genotípicas y de 2x2 para las alélicas. La probabilidad de distribución fue estimada mediante el análisis estadístico Chi-cuadrado y cuando uno de los valores esperados era menor de 5, se aplicó el test de Fischer. Se recoge el valor de la p de dos colas, ya que la hipótesis de partida es que existe una diferencia entre enfermos y controles sin presuponer un aumento o una disminución de un alelo dado. Este método se aplicó igualmente al resto de las estratificaciones realizadas (forma clínica de EM (RR vs PP), género (hombres vs mujeres), progresión (rápida vs lenta), infección por HHV6 (infectados vs no infectados), estatus *DRB1\*15:01* (portadores del alelo de susceptibilidad vs no portadores) y Edad de Debut (menores de 18 años vs mayores de 18 años) y al estudio de respuesta terapéutica (respondedores vs no respondedores).

Los intervalos de confianza de las Odds Ratio (OR) al 95% se estimaron con el método de Cornfield, o en caso necesario, se determinaron sus límites exactos.

Todos estos cálculos se realizaron con el paquete informático de análisis estadístico Epi Info v6.02® (CDC, Estados Unidos/ WHO, Suiza).

## 2. Estudio de Haplotipos.

Para el estudio de los haplotipos usamos el algoritmo de Expectación-Maximización<sup>270</sup>, implementado en el software Haploview 4.0<sup>271</sup> para cálculo de frecuencias haplotípicas, que estima los diferentes haplotipos presentes en una población así como sus frecuencias a partir de los datos que obtenemos al genotipar las muestras. La comparación entre los haplotipos hallados en enfermos y los hallados en controles se efectuó mediante una Chi-cuadrado global.

El desequilibrio de ligamiento entre SNPs se midió empleando el parámetro D' calculado combinando el método de expectación-maximización con el algoritmo de partición-ligación<sup>270</sup>, ambos empleados por el programa Haploview 4.0<sup>271</sup>.

El principal requisito para analizar marcadores genéticos es que estos se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control (para asegurar su estabilidad a lo largo de las distintas generaciones). Para el cálculo del equilibrio de H-W se empleó el software Haploview 4.0<sup>271</sup> para SNPs y el software Pedstats 0.6.12<sup>272</sup> para microsatélites.

Para estimar las frecuencias haplotípicas y el desequilibrio de ligamiento del microsatélite junto a los SNPs para el gen *Foxp3* se empleó el software 2LD<sup>273</sup>, implementado con los algoritmos de Expectación-Maximización y Partición-ligación.

## 3. Tagging.

Se empleó el programa para tagging del proyecto HapMap<sup>274</sup> para calcular el tanto por ciento de la variabilidad de los genes *TLR4*, *CD46* y *Foxp3* cubierta por nuestra selección de SNPs (y microsatélite en caso de *Foxp3*) y asegurar que se alcanzaba como mínimo un 85% de dicha variabilidad. Esta metodología ha mostrado ser tan eficaz como el estudio de todos los SNPs de un gen para la realización de estudios de asociación basados en la variabilidad genética<sup>111</sup>.



*El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra.*  
*Claude Bernard (1813-1878).*





# Resultados y Discusión

## A. Genes Analizados

Los datos epidemiológicos parecen apoyar la hipótesis de que uno (o varios) agentes infecciosos están implicados en el desarrollo de EM, aunque no está claro si esta implicación es a nivel etiopatogénico.

Debido a la controversia existente en la actualidad respecto a la relación entre la infección y el desarrollo / gravedad de la enfermedad, no ha sido posible determinar por el momento la relación exacta entre ellos. Sin embargo, esto no implica que no se deba continuar esta línea de investigación, estudiando los posibles agentes infecciosos, agentes medioambientales, factores epigenéticos y por supuesto los distintos mecanismos inmunes que puedan estar implicados en el desarrollo de la EM. Por ello es interesante estudiar a nivel genético, ahora que disponemos de los medios apropiados, aquellas moléculas del SI, que por su función en los distintos procesos inmunológicos (respuesta a infección, inflamación, regulación del SI, etc...), pudiesen arrojar algo de luz para desentrañar la relación entre la infección y los otros agentes medioambientales, y la predisposición genética para el padecimiento de EM. A través de una aproximación metódica y sistematizada de los componentes del SI, podremos dar con claves que conduzcan a desentrañar los complejos mecanismos que conducen a la alteración del SI y a una mejor comprensión de los procesos inmunológicos que subyacen en la etiopatogenia de esta enfermedad.

Estudios como éste son importantes, porque aunque en los últimos años se hayan producido avances en la comprensión del mecanismo patogénico de la EM<sup>144 275 276</sup> que aportan una importante guía para el diseño de estudios experimentales y futuros análisis, quedan por dilucidar respuestas definitivas a su etiología y patogenia.

Las últimas teorías relacionan la EM con episodios infecciosos (uno o varios agentes causantes de una infección persistente en el SNC), que en un contexto genético adecuado, provocarían el desarrollo de la EM. Es necesario un estudio riguroso de genes candidatos, que predisponen a padecer EM<sup>142 149 277-280</sup>, e intentar dar con las respuestas que nos aproximen al entendimiento de la alteración del SI de esta enfermedad y para permitir un mejor diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los afectos. Además, el estudio de SNPs se ha convertido en el método más empleado para la búsqueda de loci con efecto moderado sobre la EM<sup>281</sup>.

En todos los genes estudiados se realizaron los siguientes análisis:

- Genotipado (comparación de frecuencias genotípicas, alélicas y carriers de enfermos vs controles)
- Cálculo de D' y estudio de haplotipos (en aquellos genes en que los SNPs seleccionados para su análisis cubrían al menos el 85% de la variabilidad del gen)
- Estratificación, tanto a nivel de SNP como haplotípico, por:
  - *HLA-DRB1\*15:01* (portadores vs no portadores del alelo de susceptibilidad)
  - Forma Clínica (PP vs No PP)
  - HHV6 (presencia vs ausencia del virus en pacientes de EM)
  - Género (hombres vs mujeres). Para todos los genes analizados se comprobó, tanto a nivel de SNP como de haplotipo, que no existían diferencias significativas entre hombres y mujeres en los controles.
  - Progresión (progresión rápida vs progresión lenta de la enfermedad).
  - Edad de debut (menores de 18 años vs mayores de 18 años y menores de 50 años).

Se mostrarán los resultados de genotipado y haplotipos para todos los genes analizados.

En el caso de las distintas estratificaciones sólo se mostrarán aquellos resultados estadísticamente significativos.

## 1. TLR4

El TLR4 podría estar implicado en patologías de tipo autoinmune, ya que los ratones deficientes en MyD88 (clave en la transducción intracelular de señales inducidas por TLRs) son resistentes a EAE<sup>282</sup>. Además, estos ratones presentan reducción de la diferenciación de LT hacia Th1 y parece que desarrollan resistencia a la respuesta Th2 a través de TLR4<sup>283</sup>.

Las proteínas de la familia Nod<sup>284</sup> presentan un dominio LRR en el citoplasma (presentes también en el TLR4) y están implicadas en la respuesta inflamatoria, posiblemente a través del reconocimiento de fragmentos de LPS. Ciertas mutaciones en Nod-2 (receptor de componentes bacterianos) están asociadas a la enfermedad de Crohn<sup>285 286</sup>.

La estimulación de LB autorreactivos por un complejo IgG/cromatina activa sinérgicamente la vía de señalización del receptor de antígeno y la vía de los TLRs, lo que sugiere una comunicación cruzada entre ambos componentes del SI en las enfermedades autoinmunes<sup>287</sup>.

Se produce un aumento en la expresión de TLR4 en superficie de Treg CD4+CD25+ tras su estimulación con LPS<sup>288</sup>. Por otro lado, existe aumento de su expresión en distintos componentes del SNC (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) con distintos patrones en situaciones de alteración neurológica<sup>289</sup>, observándose también un aumento de la expresión de TLR4 en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica o el Alzheimer<sup>33</sup>.

Ante estas evidencias, nos proponemos estudiar la implicación del gen *TLR4* (como gen completo –tagging–) en la EM.

### 1.1. Genotipado.

Se realizó el genotipado en 9 SNPs del gen que cubren más del 85% de su variabilidad. La comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas no mostraron diferencias significativas para ninguno de los SNPs (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Comparación de las frecuencias genotípicas para cada uno de los nueve SNPs analizados en *TLR4* en enfermos de EM y en controles.

SNPs <i>TLR4</i>	11		12		22		P	Chi cuadrado
	EM	Cont	EM	Cont	EM	Cont		
rs2737191	194	276	141	160	27	31	0,28	2,52
1:A; 2:G	(54%)	(59%)	(39%)	(34%)	(7%)	(7%)		
rs10818073	321	422	38	42	3	3	**	**
1:C; 2:T	(89%)	(90%)	(10%)	(9%)	(1%)	(1%)		
rs11536869	319	421	40	45	3	1	**	**
1:A; 2:G	(88%)	(90%)	(11%)	(10%)	(1%)	(0%)		
rs1927911	203	255	132	175	27	37	0,90	0,19
1:C; 2:T	(56%)	(55%)	(36%)	(37%)	(7%)	(8%)		
rs12377632	132	175	180	215	50	77	0,45	1,59
1:C; 2:T	(36%)	(37%)	(50%)	(46%)	(14%)	(16%)		
rs1927907	271	342	80	112	11	13	0,80	0,43
1:A; 2:G	(75%)	(73%)	(22%)	(24%)	(3%)	(3%)		
rs2770146	183	258	153	170	26	39	0,22	3,00
1:A; 2:G	(51%)	(55%)	(42%)	(36%)	(7%)	(8%)		
rs5030717	287	368	68	88	7	11	0,91	0,17
1:A; 2:G	(79%)	(79%)	(19%)	(19%)	(2%)	(2%)		
rs1554973	218	278	125	164	19	25	0,98	0,04
1:C; 2:T	(60%)	(60%)	(35%)	(35%)	(5%)	(5%)		

\*\*Chi cuadrada no válida, uno de los valores esperados es menor de 5. \*\* Test exacto de Fisher, p a 2 colas. EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 5. Comparación de las frecuencias alélicas para cada uno de los nueve SNPs analizados en *TLR4* en enfermos de EM y en Controles.

SNPs <i>TLR4</i>	1		2		p	Odds Ratio*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
rs2737191	529	712	195	222	0,14	0,85 (0,67-1,06)
1:A; 2:G	(73%)	(76%)	(27%)	(24%)		
rs10818073	680	886	44	48	0,40	0,84 (0,54-1,30)
1:C; 2:T	(94%)	(95%)	(6%)	(5%)		
rs11536869	678	887	46	47	0,24	0,78 (0,50-1,21)
1:A; 2:G	(94%)	(95%)	(6%)	(5%)		
rs1927911	538	685	186	249	0,65	1,05 (0,84-1,32)
1:C; 2:T	(74%)	(73%)	(26%)	(27%)		
rs12377632	444	565	280	369	0,73	1,04 (0,84-1,27)
1:C; 2:T	(61%)	(60%)	(39%)	(40%)		
rs1927907	622	796	102	138	0,69	1,06 (0,79-1,41)
1:A; 2:G	(86%)	(85%)	(14%)	(15%)		
rs2770146	519	686	205	248	0,42	0,92 (0,73-1,14)
1:A; 2:G	(72%)	(73%)	(28%)	(17%)		
rs5030717	642	824	82	110	0,78	1,05 (0,76-1,43)
1:A; 2:G	(87%)	(88%)	(13%)	(12%)		
rs1554973	561	720	163	214	0,85	1,02 (0,81-1,30)
1:C; 2:T	(77%)	(77%)	(23%)	(23%)		

\*Odds Ratio con un IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2X2 con 2 grados de libertad. EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Estos resultados corroboran los encontrados en un estudio europeo en 150 pacientes de EM<sup>290</sup>, en el que no observaron asociación entre la EM y el polimorfismo Asp299Gly, equivalente al SNP rs10817073. Además nuestro trabajo es más completo en cuanto al número de SNPs estudiados y en cuanto a la potencia del estudio (N=362) y se ve ratificado por

estudios de barrido genómico más recientes, en los que tampoco se detecta asociación entre SNPs de este gen y la EM<sup>107 115 275 291</sup>.

## 1.2. Estratificación.

### 1.2.1. HLA-DRB1\*15:01

Dada la conocida implicación del *HLA-DRB1\*15:01* como factor de susceptibilidad en EM, es imprescindible realizar el análisis del *TLR4* estratificado por este alelo, ya que la asociación del *TLR4* con la EM podría ser dependiente de dicho estatus.

La comparación entre enfermos *HLA-DRB1\*15:01* positivos (15:01+) y *HLA-DRB1\*15:01* negativos (15:01-) no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario significativas para 8 de los 9 SNPs (datos no mostrados). Sin embargo, las frecuencias alélicas y de carriers del SNP rs11536869 presentaban una significación menor de 0,05 entre enfermos 15:01+ y 15:01- (Tabla 6). Por ello se realizó la comparación del grupo de los *HLA-DRB1\*15:01* positivos frente a los controles (Tabla 6), aumentando ligeramente la significación, pero ésta se perdería al aplicar la corrección de Bonferroni para las comparaciones efectuadas.

Tabla 6. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs11536869 de *TLR4*, en enfermos de EM estratificados por *HLA-DRB1\*15:01* y en controles.

<b>TLR4</b> rs11536869A/G		<b>15:01+ (N=136)</b>		<b>15:01- (N=222)</b>		<b>Controles (N=467)</b>		<b>15:01+ vs. 15:01-</b>		<b>15:01+ vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>P</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	2	1	1	1	1	0				
	<b>AG</b>	20	15	20	9	45	10	0,14	$\chi^2= 3,93$	<b>0,04</b>	$\chi^2= 6,33$
	<b>AA</b>	114	84	201	90	421	90				
<b>Alélicas</b>	<b>G</b>	24	9	22	5	47	5				
	<b>A</b>	248	91	422	95	887	95	<b>0,04</b>		<b>0,01</b>	<b>1,83 (1,06-3,03)</b>
	<b>GG+AG</b>	22	16	21	10	46	10				
	<b>AA</b>	114	84	201	90	421	90	<b>0,05</b>		<b>0,04</b>	<b>1,77 (0,98-3,16)</b>

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2X2 con 2 grados de libertad.  
15:01+: portadores de *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01-: no portadores de *HLA-DRB1\*15:01*.

Estos datos podrían sugerir la existencia de una relación entre la molécula presentadora de clase II y el *TLR4* para el desarrollo de EM. Sin embargo, esta interacción no

soporta corrección, de lo que deducimos que no existe asociación entre el alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01* y el *TLR4* para el desarrollo de EM.

### 1.2.2. Forma Clínica

Los brotes y el empeoramiento de la clínica de EM coinciden en ocasiones con infecciones bacterianas, principalmente bacterias gram negativas que contienen LPS. Por ello, es posible que *TLR4*, que reconoce distintos agentes microbianos, pudiera estar implicado selectivamente en alguna forma clínica de EM.

De hecho, conocemos la asociación de determinados haplotipos del *TLR4* con la clínica de otras enfermedades (alguna de ellas de tipo autoinmune) como la reducción del riesgo de aterosclerosis<sup>292</sup>, el aumento del riesgo de colitis ulcerosa<sup>293</sup> y la mayor prevalencia de infecciones por gram negativos<sup>294</sup>. Por ello, estudiamos la posibilidad de encontrar asociación entre las distintas formas clínicas de EM y el *TLR4*.

La estratificación por PP y No PP no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario para 7 de los SNPs. Para los SNP rs2737191 y rs1927911 los genotipos, las frecuencias alélicas y/ o entre portadores del alelo minoritario presentaban una significación menor de 0,05 (Tabla 7), por lo que se realizó la comparación del grupo de los PP frente a los controles. En este segundo análisis, la significación o se perdía o empeoraba y en ningún caso soportaba corrección estadística (datos no mostrados).

El *TLR4* no parece, por lo tanto, estar asociado con la forma clínica de la EM, como tampoco se ha visto implicado en la clínica de otras enfermedades de tipo autoinmune como la oftalmopatía en la enfermedad de Graves<sup>295</sup>, o de tipo inflamatorio como la arteritis de células gigantes<sup>296</sup>.

Tabla 7. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para los SNPs rs2737191 y rs1927911 de *TLR4* en enfermos de EM estratificados por forma clínica.

<b>TLR4</b>		<b>PP (N=29)</b>		<b>No PP (N=310)</b>			
<b>rs2737191 A/G</b>		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>	
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	3	1	23	7		
	<b>AG</b>	5	17	124	40	<b>0,05</b>	$\chi^2 = 5,83$
	<b>AA</b>	21	72	163	53		
	<b>G</b>	11	19	170	27		
	<b>A</b>	47	81	450	73	0,16	
	<b>GG+AG</b>	8	28	147	47	<b>0,04</b>	
	<b>AA</b>	21	72	163	53		
<b>rs1927911 C/T</b>		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>	
<b>Genotípicas</b>	<b>TT</b>	2	7	25	8		
	<b>CT</b>	17	59	107	34	<b>0,03</b>	$\chi^2 = 6,77$
	<b>CC</b>	10	34	178	57		
	<b>T</b>	21	36	157	25		
	<b>C</b>	37	64	463	75	<b>0,07</b>	
	<b>TT+CT</b>	19	66	132	43	<b>0,01</b>	
	<b>CC</b>	10	34	178	57		

PP: Primarios Progresivos. No PP: No Primarios Progresivos.

### 1.2.3. Resto de estratificaciones

La distribución genotípica dentro de cada una de las subclasificaciones (infección por HHV6, género, progresión y edad de debut) es similar entre los grupos comparados. A pesar de que el *TLR4* es una molécula de respuesta a distintos agentes infecciosos como los herpes virus, no parece estar asociado a la presencia de HHV6 en pacientes con EM.

El *TLR4* está relacionado con el inicio tardío de la enfermedad de Alzheimer<sup>297</sup>. Sin embargo, no hemos encontrado relación entre el momento de inicio de la EM y el *TLR4*, si bien en nuestro estudio la comparación se ha realizado estratificando por edad de inicio temprano frente a inicio habitual, habiéndose descartado las formas tardías, debido a su baja prevalencia en nuestra población. Esto podría explicar la discrepancia entre estas 2 enfermedades neurodegenerativas, unido al hecho de que la EM es además una enfermedad autoinmune.

Los estrógenos están relacionados con la expresión de *TLR4*<sup>298</sup>, hecho que ha sido observado en un contexto infeccioso y en ratones, lo que difiere del ámbito estudiado por



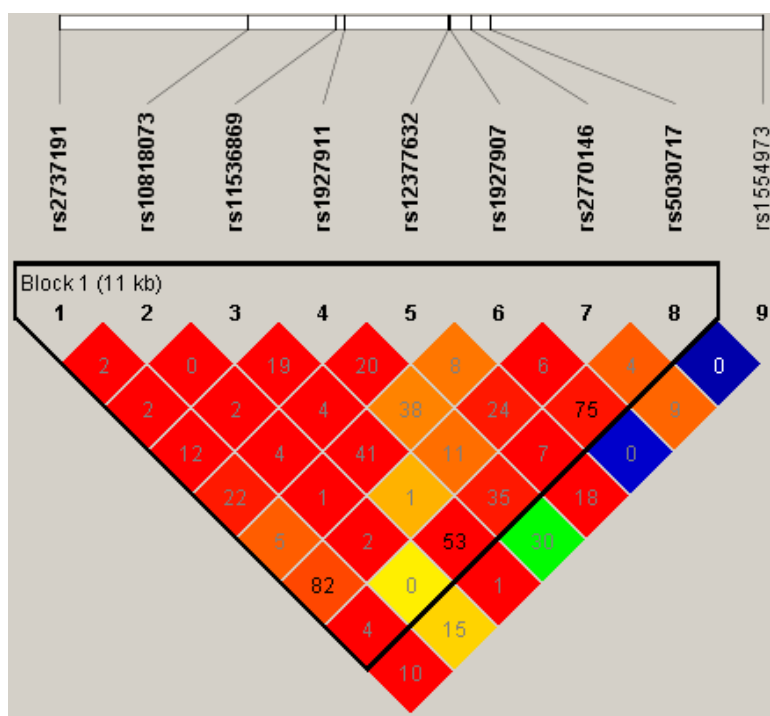
nosotros y podría explicar la ausencia de asociación observada del *TLR4* con el género en la EM.

La progresión de la enfermedad está marcada (al igual que la susceptibilidad) por múltiples factores, algunos de ellos infecciosos<sup>160 182</sup>, que podrían actuar a través del *TLR4*<sup>226 227</sup> y cuya implicación en la evolución de la EM podría deberse a la variabilidad genética. Sin embargo, al igual que para las otras características fenotípicas de la EM (clínica y edad de debut), no se ha encontrado relación entre *TLR4* y este aspecto de la EM.

Además, esta ausencia de asociación entre *TLR4* y el género, la infección por HHV6, la progresión y la edad de debut, podría deberse a la baja potencia estadística derivada del pequeño tamaño muestral resultante de la estratificación.

### 1.3. Cálculo de DL y estimación de Haplotipos.

Al calcular el Desequilibrio de Ligamiento (DL) (Fig. 29) observamos que los primeros ocho SNPs (orden 5'→3') presentan un fuerte DL ( $D'$  muy cercano a  $D'=1$ ), mientras que el noveno SNP (ubicado en la zona intergénica) presenta un menor grado de DL. Cuando el DL entre parejas de SNPs es  $D'=1$ , los haplotipos que forman entre ellos pueden deducirse siempre en un individuo. Esto permite realizar el recuento directo de los haplotipos formados por los primeros ocho SNPs, que confirmaron la precisión del cálculo de Expectación-Maximización. La comparación de las frecuencias de los haplotipos hallados (formados por los primeros 8 SNPs) entre los enfermos de EM y los controles no reveló diferencias significativas en el caso del *TLR4* (Tabla 8).



**Fig. 29.** Cálculo del DL para *TLR4* en población control.

DL: Desequilibrio de ligamiento. Números:  $r^2$ .

Colores: rojo es  $D':1$  (Cuanto menor es  $D'$  más se aleja del color rojo).

Tabla 8. Haplotipos de *TLR4* para los 8 primeros SNPs en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM y de controles. Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos <i>TLR4</i>	EM (N=749)		Controles (N=1043)		p	OR (95 %CI)*
	N	%	n	%		
ACAATCTA	287	38	408	39	0,73	0,97 (0,79-1,18)
GCAACCCA	200	27	243	23	<b>0,09</b>	<b>1,20 (0,96-1,50)</b>
ACAGCCTA	90	12	131	13	0,71	0,95 (0,71-1,28)
ACAGCTTG	37	5	72	7	<b>0,08</b>	<b>0,70 (0,46-1,07)</b>
ACGGCTTG	45	6	52	5	0,34	1,22 (0,79-1,87)
ATAACCTA	45	6	46	4	0,12	1,39 (0,89-2,16)
ACAGCTTA	17	2	32	3	0,30	0,73 (0,39-1,38)
ACAACCTA	15	2	31	3	0,20	0,67 (0,34-1,29)
ACAACCCA	13	2	28	3	0,18	0,64 (0,31-1,30)

P global= 0,13;  $\chi^2= 12,34$ .

\*Odds Ratio con un IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

EM: Esclerosis Múltiple.

La ausencia de asociación a nivel haplotípico corrobora los resultados del análisis individual de SNPs de *TLR4*. Esta ausencia de asociación podría atribuirse al tamaño muestral,

pues la potencia estadística en este estudio nos permite detectar, con un confianza del 95% y con una probabilidad del 80% para el alelo de menor frecuencia, efectos con una OR de 1,65.

### 1.3.1. Estratificación de haplotipos

La estratificación de haplotipos por las distintas categorías no mostró diferencias significativas. Esto apoya la corrección a los resultados observados para la estratificación por *HLA-DRB1\*15:01* que sugerían una posible asociación y que desaparecían al ser corregidos.

De esta forma y debido al amplio análisis del *TLR4* realizado, que comprende un tagging completo del gen, un estudio genotípico y alélico de 9 polimorfismos del *TLR4* y de sus variantes haplotípicas, podemos afirmar que el *TLR4* no parece ser un determinante directo en la susceptibilidad de la EM globalmente considerado, ni teniendo en cuenta el estatus de portador de *HLA-DRB1\*15:01*, el estatus clínico, la progresión, la edad de inicio o la infección por HHV6 en esta enfermedad.

## 2. CD46

En el año 2000 se demostró la presencia de Ac frente a CD46 en el contexto de la EM, observándose que los niveles de Ac antiCD46 son mayores en pacientes con EM que en controles<sup>180-182</sup>. El CD46 parece contribuir a la inflamación en la EM, como puede deducirse de estudios realizados en pacientes con la forma RR. Se ha observado que la producción de IL-10 en respuesta a la estimulación de CD46 está disminuida, y las CDs en pacientes secretan mayor cantidad de moléculas proinflamatorias cuando son activadas por CD46<sup>299</sup>. A su vez se ha descrito el aumento de los niveles séricos de CD46 en enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren<sup>300</sup>, el LES<sup>301</sup> e incluso la EM<sup>181 182</sup>, donde se observa una asociación física entre el virión HHV6 y el CD46 no observada en individuos sanos. Así, en un reciente estudio<sup>182</sup>, los niveles aumentados de CD46 en pacientes de EM infectados por HHV6 se correlacionan con la carga viral. Esto sugiere que la presencia de complejos HHV6/CD46 intracelulares puede contribuir al aumento de CD46 sérico observado en la EM<sup>181</sup>. Por otro lado, en las infecciones por HHV6 existe una reducción progresiva del CD46 en la superficie celular de la célula infectada<sup>302</sup>. Esta disminución secundaria a infección podría estar induciendo la activación del complemento y con ello aumentando la vulnerabilidad celular a la lisis mediada por complemento<sup>303</sup>.

Si tenemos en cuenta la presencia de HHV6 en pacientes de EM; el efecto del CD46 controlando la producción de citoquinas por parte de los LT<sup>231</sup>; el efecto del HHV6 sobre el CD46 y las alteraciones observadas en la EM es factible considerar que el CD46 pueda estar implicado en el proceso fisiopatológico de la EM en relación a la infección por HHV6. A la vista de esta relación funcional entre el CD46 y el HHV6 y los LT, nos proponemos determinar si se trata de un mecanismo casual en el contexto de la EM y si la variabilidad genética de *CD46* se asocia con la predisposición a EM.

## 2.1. Genotipado.

Se genotiparon 5 SNPs del gen, que cubren más del 95% de su variabilidad.

La comparación de las frecuencias mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas y para portadores del alelo minoritario (Tablas 9 a 11).

Tabla 9. Comparación de las frecuencias genotípicas para cada uno de los cinco SNPs analizados en *CD46* en enfermos de EM y en controles.

SNPs <i>CD46</i>	11		12		22		p	Chi cuadrado
	EM	Cont	EM	Cont	EM	Cont		
<b>rs2796267</b>	260	264	268	234	72	65	0,46	1,52
<b>1:A; 2:G</b>	(43%)	(46%)	(45%)	(42%)	(12%)	(12%)		
<b>rs2724385</b>	165	187	296	266	138	108	<b>0,06</b>	<b>5,40</b>
<b>1:A; 2:T</b>	(28%)	(33%)	(49%)	(47%)	(23%)	(19%)		
<b>rs2796269</b>	238	210	290	268	80	83	0,67	0,78
<b>1:C; 2:T</b>	(39%)	(37%)	(48%)	(48%)	(13%)	(15%)		
<b>rs6657476</b>	398	381	184	161	26	17	0,42	1,73
<b>1:T; 2:G</b>	(66%)	(68%)	(30%)	(29%)	(4%)	(3%)		
<b>rs859706</b>	269	272	264	238	73	52	0,19	3,24
<b>1:A; 2:G</b>	(44%)	(48%)	(44%)	(42%)	(12%)	(9%)		

EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 10. Comparación de las frecuencias alélicas para cada uno de los cinco SNPs analizados en *CD46* en enfermos de EM y en controles.

SNPs <i>CD46</i>	1		2		p	Odds Ratio*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
<b>rs2796267</b>	788	762	412	364	0,30	1,09 (0,92-1,31)
<b>1:A; 2:G</b>	(66%)	(68%)	(34%)	(32%)		
<b>rs2724385</b>	626	640	572	482	<b>0,02</b>	<b>1,21 (1,03-1,43)</b>
<b>1:A; 2:T</b>	(52%)	(57%)	(48%)	(43%)		
<b>rs2796269</b>	766	688	450	434	0,40	0,93 (0,79-1,10)
<b>1:C; 2:T</b>	(63%)	(61%)	(37%)	(39%)		
<b>rs6657476</b>	980	923	236	195	0,22	1,14 (0,92-1,41)
<b>1:T; 2:G</b>	(81%)	(83%)	(19%)	(17%)		
<b>rs859706</b>	802	782	410	342	<b>0,07</b>	<b>1,17 (0,98-1,40)</b>
<b>1:A; 2:G</b>	(66%)	(70%)	(34%)	(30%)		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 11. Comparación de las frecuencias de portadores del alelo minoritario para cada uno de los cinco SNPs analizados en *CD46* en enfermos de EM y en Controles.

SNPs <i>CD46</i>	Portador 2		No portador 2		p	Odds Ratio*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
<b>rs2796267</b>	340	299	260	264	0,22	1,15 (0,91-1,46)
<b>1:A; 2:G</b>	(57%)	(53%)	(43%)	(47%)		
<b>rs2724385</b>	434	374	165	187	<b>0,03</b>	<b>1,32 (1,02-1,70)</b>
<b>1:A; 2:T</b>	(72%)	(67%)	(28%)	(33%)		
<b>rs2796269</b>	370	351	238	210	0,54	0,93 (0,73-1,19)
<b>1:C; 2:T</b>	(61%)	(63%)	(39%)	(37%)		
<b>rs6657476</b>	210	178	398	381	0,32	1,13 (0,88-1,45)
<b>1:T; 2:G</b>	(34%)	(32%)	(66%)	(68%)		
<b>rs859706</b>	337	290	269	272	0,16	1,18 (0,93-1,49)
<b>1:A; 2:G</b>	(56%)	(52%)	(44%)	(48%)		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Los resultados observados no soportan corrección estadística y además, hasta la fecha, no se ha publicado asociación entre la región cromosómica donde se encuentra *CD46* (1q32-q33) y la EM en ninguno de los estudios de barrido genómico. Esto último, puede deberse a que estos estudios cubren grandes regiones cromosómicas, pudiendo pasar por alto el efecto de genes concretos, tanto por una cobertura de baja densidad de esa región como por el estricto umbral de significación aplicado en los mismos. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que *CD46* pudiera estar implicado en la EM, siendo interesante la replicación del estudio en una cohorte independiente para verificar la validez de estos resultados. De hecho, se ha visto que cumple un efecto regulador de la autoinmunidad, con funciones pro y antiinflamatorias. En la EM su acción es intensamente proinflamatoria, con importantes alteraciones en la producción de citoquinas y con un efecto regulador sobre la acción de Treg<sup>304 305</sup> (cuyo papel en la EM parece cada vez más claro<sup>55 306</sup>). Además, la interacción de *CD46* con *CD3* provoca la diferenciación de LT *CD4+* hacia un subtipo celular único, caracterizado por la expresión aumentada de IFN gamma, IL10 y LIGHT, entre otras moléculas, todas ellas relevantes en el proceso de la EM<sup>307</sup>.

## 2.2. Estratificación.

### **2.2.1 HLA-DRB1\*15:01**

La comparación entre 15:01+ y 15:01- no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo de mayor frecuencia para 4 de los SNPs (datos no

mostrados). Sin embargo, en las frecuencias genotípicas y alélicas el SNP rs859706 presentaba significación estadística. Por ello se realizó la comparación del grupo de los 15:01+ frente a los controles, manteniéndose la significación (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente para el SNP rs859706 de *CD46* en enfermos de EM estratificados por *HLA-DRB1\*15:01* y en controles.

<b>CD46 rs859706 A/G</b>		<b>15:01+ (N=210)</b>		<b>15:01- (N=380)</b>		<b>Controles (N=562)</b>		<b>15:01+ vs. 15:01-</b>		<b>15:01+ vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR (95%CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	38	18	35	9	52	9				
	<b>AG</b>	85	40	172	48	238	42	<b>0,007</b>	$\chi^2=9,79$	<b>0,002</b>	$\chi^2=11,98$
	<b>AA</b>	87	41	173	46	272	48				
<b>Alélicas</b>	<b>G</b>	161	38	242	32	342	30	<b>0,02</b>		<b>0,003</b>	<b>1,41 (1,11-1,79)</b>
	<b>A</b>	259	62	518	68	782	70				
	<b>GG</b>	38	18	35	9	52	9	<b>0,001</b>		<b>0,0006</b>	<b>2,17 (1,34-2,49)</b>
	<b>AA+AG</b>	172	82	345	91	510	91				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
15:01+: portadores de *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01- no portadores de *HLA-DRB1\*15:01*.

Estos datos sugieren que entre los genes que codifican la molécula presentadora de clase II y el *CD46* puede existir efecto aditivo de susceptibilidad para el desarrollo de EM, de forma que el alelo de menor frecuencia confiere un riesgo añadido al desarrollo de EM en los enfermos portadores del alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01*.

Se ha descrito con anterioridad que un SNP que a priori no ha mostrado asociación a la EM de forma global, si puede mostrarla al ser estudiado en un grupo de pacientes seleccionados por el alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01*<sup>120 308 309</sup>. La EM es una enfermedad en la que se asume intervienen múltiples factores y la interacción gen-gen podría tener un papel. Esta acción conjunta de genes podría explicar, al menos en parte, la variabilidad observada en esta enfermedad.

El SNP rs859706 no mostraba asociación significativa con la predisposición a padecer EM, pero si una tendencia (p=0,07, frecuencias alélicas). Es posible que el efecto de *CD46* aisladamente no sea significativo, pero que éste se vea intensificado en el grupo de pacientes 15:01+, de forma que este grupo que ya presenta predisposición a EM, vea su riesgo incrementado si además son portadores del alelo minoritario del rs859706 de *CD46*.

### 2.2.2. Progresión

La comparación entre enfermos de EM progresores rápidos y lentos, mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente para 3 de los SNPs. Aunque esta significación se pierde al aplicar corrección, mantiene una tendencia para todos los SNPs, en la que se observa que para 2 de los SNPs el alelo minoritario confiere una protección frente a la progresión rápida de la enfermedad, mientras que el tercero de los SNPs confiere predisposición a una forma rápida de la enfermedad (Tablas 13 - 15). Al enfrentar cada uno de los grupos frente a controles se observa que ninguno de los 2 SNPs presenta diferencias significativas entre controles y PR (datos no mostrados), pero muestran diferencias significativas entre el grupo de los enfermos con PL y los controles (Tablas 13 y 14) confiriendo predisposición hacia una forma lenta de la enfermedad. El tercero de los SNPs muestra diferencias significativas entre el grupo de los enfermos con PR y los controles (Tabla 15) (no entre controles y PL –datos no mostrados-), confiriendo predisposición hacia una forma de progresión rápida de EM. Los 2 SNPs restantes no mostraban diferencias a ningún nivel (datos no mostrados).

Tabla 13. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente para el SNP rs2796267 del gen *CD46* en enfermos de EM estratificados por progresión y en enfermos de EM con PL frente a controles.

<b>CD46 rs2796267 A/G</b>		<b>PR (N=63)</b>		<b>PL (N=49)</b>		<b>Controles (N=563)</b>		<b>PR vs. PL</b>		<b>PL vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	4	6	12	24	65	12				
	<b>AG</b>	30	48	18	37	234	42	<b>0,02</b>	$\chi^2=7,45$	<b>0,03</b>	$\chi^2=6,90$
	<b>AA</b>	29	46	19	39	264	46				
<b>Alélicas</b>	<b>G</b>	38	30	42	43	364	32	<b>0,04</b>		<b>0,03</b>	<b>1,57 (1,01-2,44)</b>
	<b>A</b>	88	70	56	57	762	68				
	<b>GG</b>	4	6	12	24	65	12	<b>0,006</b>		<b>0,008</b>	<b>2,48 (1,16-5,24)</b>
	<b>AA+AG</b>	59	94	37	76	498	88				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2X2 con 2 grados de libertad. PR: Progresión Rápida. PL: Progresión Lenta.



Tabla 14. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente para el SNP rs859706 del gen *CD46* en enfermos de EM estratificados por progresión y en enfermos de EM con PL frente a controles.

<b>CD46</b> <b>rs859706 A/G</b>		<b>PR</b> <b>(N=62)</b>		<b>PL</b> <b>(N=50)</b>		<b>Controles</b> <b>(N=562)</b>		<b>PR vs. PL</b>		<b>PL vs. Controles</b>	
		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	4	6	13	26	52	9				
	<b>AG</b>	27	44	16	32	238	42	<b>0,01</b>	$\chi^2=8,31$	<b>0,001</b>	$\chi^2=13,70$
	<b>AA</b>	31	50	21	42	272	42				
<b>Alélicas</b>	<b>G</b>	35	28	42	42	342	30	<b>0,03</b>		<b>0,01</b>	<b>1,66 (1,07- 2,57)</b>
	<b>A</b>	89	72	58	58	782	70				
	<b>GG</b>	4	6	13	26	52	91	<b>0,004</b>		<b>0,0002</b>	<b>3,45 (1,62-7,23)</b>
	<b>AA+AG</b>	58	94	37	74	510	9				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
PR: Progresión Rápida. PL: Progresión Lenta.

Tabla 15. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente para el SNP rs2724385 del gen *CD46* en enfermos de EM estratificados por progresión y en enfermos de EM con PL frente a controles.

<b>CD46</b> <b>rs2724385 A/T</b>		<b>PR</b> <b>(N=62)</b>		<b>PL</b> <b>(N=48)</b>		<b>Controles</b> <b>(N=561)</b>		<b>PR vs. PL</b>		<b>PR vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR (95%CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>TT</b>	22	35	11	23	108	19				
	<b>AT</b>	29	47	20	42	266	47	<b>0,08</b>	$\chi^2=4,90$	<b>0,02</b>	$\chi^2=7,42$
	<b>AA</b>	11	18	17	35	187	33				
<b>Alélicas</b>	<b>T</b>	73	59	42	44	482	57	<b>0,02</b>		<b>0,0007</b>	<b>1,90 (1,28-2,82)</b>
	<b>A</b>	51	41	54	56	640	43				
	<b>TT</b>	22	35	11	33	108	19	<b>0,15</b>		<b>0,002</b>	<b>2,31 (1,27-4,18)</b>
	<b>AA+AT</b>	40	65	37	77	453	81				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
PR: Progresión Rápida. PL: Progresión Lenta.

EL *CD46* parece estar implicado en la regulación de la inflamación en la EM<sup>79 299</sup>. Esta proteína ha presentado efectos proinflamatorios en la regulación de LT, pero también efectos antiinflamatorios al inhibir la lisis por complemento<sup>79</sup>. Es posible que la variabilidad genética de *CD46* condicione su acción sobre la regulación de la inflamación y que este efecto intervenga en el proceso patogénico de la EM.

La EM es una enfermedad con gran variabilidad a todos los niveles. A medida que se han ido encontrando nuevos factores genéticos de susceptibilidad, se ha empezado a considerar<sup>17 129</sup> que estos factores pueden ser diferentes entre unos grupos de pacientes y otros<sup>17 138</sup>. Es posible que en el conjunto de los pacientes de EM el efecto del *CD46* esté

enmascarado, pero parece evidente que predispone a EM, pero a una forma menos agresiva de la misma. Además, no es el primer caso en el que un gen ha sido asociado a un cierto fenotipo de EM<sup>291</sup>

Son necesarios más estudios de *CD46* tanto a nivel genético como funcional, para determinar cuál es su implicación real en la patogenia de la EM, y determinar en qué pacientes está ejerciendo su efecto, ya que esto podría abrir no solo nuevas rutas de investigación para la comprensión de la EM sino también nuevas vías terapéuticas dirigidas.

### 2.2.3. Edad de Debut

La comparación entre aquellos pacientes que debutan pronto (<18 años) y aquellos que debutan entorno a la considerada edad media de debut (entre los 18 y los 50 años) mostró diferencias significativas alélicas y entre carriers para el SNP rs6657476 (Tabla 16). Los SNPs restantes no mostraban diferencias a ningún nivel (datos no mostrados). La comparación de enfermos con edad de debut clásica frente a controles (edad media= 38,8 ± 12,9), no mostraba diferencias significativas (datos no mostrados). No es posible la comparación del grupo de debut temprano frente a controles ajustados por edad, ya que no disponemos de controles menores de edad. Sin embargo la comparación de este grupo frente a controles (adultos), mostró diferencias significativas (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs6657476 del gen *CD46* en enfermos de EM estratificados por edad de debut y en controles.

<b>CD46</b> <b>rs6657476 T/G</b>		<b>&lt;18</b> <b>(N=20)</b>		<b>≥18 - ≤50</b> <b>(N=366)</b>		<b>Controles</b> <b>(N=559)</b>		<b>&lt;18 vs.</b> <b>≥18 - ≤50</b>		<b>&lt;18 vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR</b> <b>(95%CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	1	5	15	4	17	3				
	<b>TG</b>	10	50	105	29	161	29	0,11	$\chi^2=4,34$	<b>0,09</b>	$\chi^2=4,71$
	<b>TT</b>	9	45	246	67	381	68				
<b>Alélicas</b>	<b>G</b>	12	30	135	18	195	17	<b>0,06</b>		<b>0,04</b>	<b>2,03</b> <b>(0,96-4,24)</b>
	<b>T</b>	28	70	597	82	923	83				
	<b>GG+GT</b>	11	55	120	33	178	32	<b>0,04</b>		<b>0,02</b>	<b>2,62</b> <b>(0,99-7,00)</b>
	<b>TT</b>	9	45	246	67	381	68				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad. <18: pacientes con edad inferior a 18 años. ≥18 - ≤50: pacientes con edad igual o superior a 18 años y menores de 50 años.

La agrupación de pacientes por edad de inicio ha servido para identificar genes de susceptibilidad en algunas enfermedades autoinmunes<sup>310</sup> ya que en algunos casos esto condiciona la forma de la enfermedad<sup>311 312</sup>. Es posible que los pacientes con inicio temprano de la enfermedad presenten características genéticas únicas<sup>313</sup>. No podemos concluir que este sea el caso del *CD46*, pues el efecto observado es débil. Sin embargo, sería conveniente replicar este estudio caso-control ajustado por edad, para confirmar la validez de los resultados obtenidos.

#### 2.2.4. Resto de estratificaciones

La comparación entre hombres y mujeres enfermos mostró diferencias significativas entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs859706 (Tabla 17), diferencias que no aparecían entre mujeres y hombres controles (datos no mostrados). Esta diferencia no se mantenían al comparar controles hombres frente a hombres EM, ni mujeres controles frente a mujeres EM (datos no mostrados) y perdían significación estadística al aplicar corrección.

El resto de los SNPs no mostraban diferencias a ningún nivel (datos no mostrados).

Tabla 17. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs859706 del gen *CD46* en enfermos de EM estratificados por género.

<b>CD46 rs859706 A/G</b>		<b>Mujeres (N=356)</b>		<b>Hombres (N=199)</b>			
		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>	
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	42	12	23	12	0,11	$\chi^2=4,36$
	<b>AG</b>	144	40	98	49		
	<b>AA</b>	170	48	78	39		
	<b>G</b>	228	32	144	36	0,15	<b>0,05</b>
<b>Alélicas</b>	<b>A</b>	484	68	254	54		
	<b>AA</b>	170	48	78	39		
	<b>GG+AG</b>	186	52	121	61		

Aunque se pudiera pensar que *CD46* tiene algo que decir en la diferente susceptibilidad a EM entre hombres y mujeres, no existen datos en la literatura que sugieran esta asociación. La débil significación encontrada (no soporta corrección) y el hecho de que los sucesivos análisis realizados no apoyen el hallazgo, indican que el resultado se debe al azar (error tipo 1

o falso positivo) y que *CD46* no está implicado en la diferencia de susceptibilidad por género. Este tipo de error es posible cuando se realizan estudios múltiples y evidencia que es imprescindible la aplicación de corrección estadística.

El *CD46* fue identificado como receptor de HHV6 y tanto uno como otro han demostrado implicación en la EM. Existen muchas teorías de cómo la interacción *CD46*-HHV6 puede estar interviniendo en el proceso de la EM<sup>182 299</sup>, y es interesante comprobar la etiología de este efecto. Sin embargo, la comparación entre enfermos infectados por HHV6 y no infectados no mostró diferencias significativas. Esto sugiere que a pesar de existir una relación funcional entre estos 2 factores, ésta no parece condicionada por la variabilidad genética de *CD46* y que las alteraciones observadas para ambos en la EM pueden estar condicionadas por otros factores. El *CD46* no sólo es relevante por su interacción con el HHV6 sino que tiene efecto sobre distintos elementos del SI<sup>231</sup>, y es posible que los efectos del HHV6 sobre el SI no dependan de *CD46*.

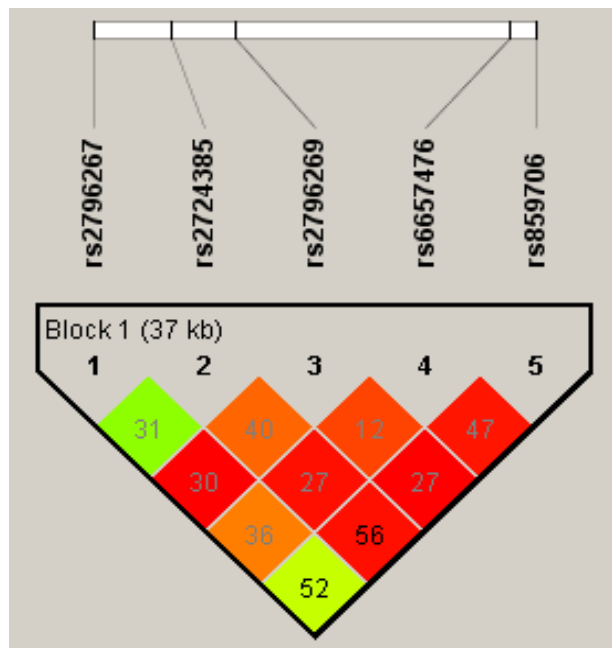
Aunque se han descrito alteraciones de la regulación del SI mediadas por *CD46* en pacientes con la forma RR de EM<sup>181 182</sup>, la comparación entre enfermos PP y No PP no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores para ninguno de los SNPs. Las alteraciones a nivel funcional en pacientes con EM siempre se han observado frente a controles, pero no existen datos que hablen de estas diferencias entre las formas clínicas de esta enfermedad. Así, parece que *CD46* no influye en la forma de presentación de la EM. Sin embargo, dicha ausencia podría deberse a la baja potencia estadística derivada del pequeño tamaño muestra resultante de la estratificación.

### 2.3. Cálculo de DL y estimación de Haplotipos.

En el cálculo del Desequilibrio de Ligamiento (DL) (Fig. 30) observamos que los cuatro últimos SNPs (orden correspondiente al que ocupan en el gen) presentan un fuerte DL (D' muy

cercano a  $D':1$ ), mientras que el primer SNP (ubicado en la zona promotora) presenta un menor grado de DL.

Cuando el DL entre parejas de SNPs es  $D'=1$ , los haplotipos que forman entre ellos pueden deducirse en un individuo. Esto permite realizar el recuento directo de los haplotipos formados por los cuatro últimos SNPs, que confirmaron la precisión del cálculo de Expectación-Maximización. Ninguno de los haplotipos presenta significación  $p<0,05$  (datos no mostrados).



**Fig. 30.** Cálculo del desequilibrio de ligamiento para *CD46* en población control. Números:  $r^2$ . Colores: rojo es  $D':1$  (Cuanto menor es  $D'$  más se aleja del color rojo).

En el estudio de los haplotipos formados por los 5 SNPs estudiados no observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar los haplotipos entre enfermos y controles (Tabla 18).

Tabla 18. Haplotipos de *CD46* más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM y de controles. Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos CD46	EM (N=1212)		Controles (N=1122)		p	OR (95 %CI)*
	n	%	n	%		
AATTA	429	35	420	37	0,30	0,92 (0,77-1,09)
GTCGG	232	19	186	17	0,10	1,19 (0,96-1,48)
AACTA	142	12	156	14	0,11	0,82 (0,64-1,06)
ATCTA	137	11	114	10	0,37	1,13 (0,86-1,48)
GTCTG	112	9	100	9	0,78	1,04 (0,78-1,39)
GACTA	66	6	64	6	0,78	0,95 (0,66-,38)
ATCTG	63	5	46	4	0,20	1,28 (0,85-1,93)
ATTTA	21	2	14	1	0,33	1,40 (0,68-2,91)
OTROS (<1%)**	10	1	22	2	<b>0,01</b>	<b>0,42 (0,18-0,93)</b>

**p global= 0,08,  $\chi^2= 13,73$**

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\*En este grupo se incluyen todos los haplotipos encontrados en enfermos y/o controles cuya frecuencia estimada es menos del 1%. EM: Esclerosis Múltiple.

A pesar de que ninguno de los haplotipos muestra asociación, si observamos tendencia a la significación global  $p=0,08$ . También individualmente el rs2724385 y el rs859706 mostraban tendencia a la asociación, lo que apunta hacia la existencia de asociación entre *CD46* y EM. Si bien, el efecto podría atribuirse exclusivamente al SNP rs2724385, cuya asociación alélica individual es la mayor observada [OR=1,23 (1,04-1,46)] y podría ser el alelo etiológico de la tendencia a la susceptibilidad a EM.

Por otro, la potencia estadística de este estudio nos permite detectar, con una probabilidad mayor del 85% para el alelo de menor frecuencia, efectos con una OR de 1,21. Así, como se apuntó previamente, sería interesante replicar el estudio de *CD46* en otras poblaciones para determinar si tiene efecto o no sobre la susceptibilidad a EM.

### 2.3.1. Estratificación de haplotipos

#### a) *HLA-DRB1\*15:01*

La estratificación de los haplotipos por *HLA-DRB1\*15:01* no mostró significación estadística a nivel global entre haplotipos al comparar enfermos 15:01- frente a 15:01+ (tabla

19). Sin embargo, varios haplotipos mostraban cierta tendencia a la significación por lo que se realizó la comparación entre portadores de *HLA-DRB1\*15:01* frente a controles (Tabla 19).

Tabla 19. Haplotipos de *CD46* más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM 15:01+ frente a 15:01- y frente a controles. Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos <i>CD46</i> 15:01	15:01+ (N=420)		15:01- (N=760)		Controles (N=1122)		15:01+ vs. 15:01-	15:01+ vs. Controles	
	n	%	n	%	n	%	p	p	OR (95 %CI)*
AATTA	146	35	271	36	420	37	0,75	0,33	0,89 (0,70-1,13)
GTCGG	90	21	138	18	186	17	<b>0,17</b>	<b>0,02</b>	<b>1,37 (1,03-1,84)</b>
AACTA	48	11	90	11	156	14	0,83	0,20	0,80 (0,56-1,14)
ATCTA	41	10	94	12	114	10	0,17	0,81	0,96 (0,65-1,41)
GTCTG	43	10	66	9	100	9	0,37	0,42	1,17 (0,0,79-1,73)
GACTA	21	5	44	6	64	6	0,56	0,58	0,87 (0,51-1,48)
ATCTG	27	6	36	5	46	4	0,21	<b>0,01</b>	<b>1,85 (1,09-3,14)</b>
ATTTA	4	1	14	2	14	1	0,23	0,43	***
OTROS (<1%)**	0	0	7	1	22	2	<b>0,04</b>	<b>0,003</b>	#

p global (15:01+ vs. 15:01-)= 0.20,  $\chi^2$ : no valida (uno de los valores esperados es <5).

**p global (15:01+ vs. Controles)= 0,01,  $\chi^2= 18,89$**

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\*En este grupo se incluyen todos los haplotipos encontrados en enfermos y/o controles cuya frecuencia estimada es menos del 1%. \*\*\*Test exacto de Fisher, p a 2 colas. 15:01+: portadores de *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01-: no portadores de *HLA-DRB1\*15:01*.

Así, al igual que ocurría en el análisis global de haplotipos, el efecto de asociación, podría atribuirse a uno de los SNPs (rs859706), cuyo efecto se ve diluido al dividir en haplotipos, pudiendo ser este el alelo etiológico responsable de la tendencia observada a la susceptibilidad a EM en los portadores de dicho alelo y del alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01*.

## b) Progresión

La estratificación de los haplotipos por la forma de progresión no mostró significación estadística a nivel global entre haplotipos al comparar enfermos PR frente a PL, pero sí se observa tendencia a la significación para uno de los haplotipos frecuentes (Tabla 20). En base a esto y a los resultados encontrados previamente a nivel de SNP individual, se realizó la comparación entre PR frente a controles, que no mostró diferencias (datos no mostrados), y de PL frente a controles (Tabla 20).

Tabla 20. Haplotipos de *CD46* más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM PR frente a PL. Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos <i>CD46</i> Progresión	PR (N=126)		PL (N=100)		Controles (N=1122)		PL vs. PR	PL vs. Controles	
	n	%	n	%	n	%	p	p	OR (95 %CI)*
AATTA	50	40	33	33	420	37	0,30	0,37	0,82 (0,52-1,30)
GTCGG	20	16	23	33	186	17	0,17	0,10	1,50 (0,89-2,52)
AACTA	17	13	6	6	156	14	<b>0,06*</b>	<b>0,02</b>	***
ATCTA	14	11	11	11	114	10	0,97	0,79	1,09 (0,54-2,18)
GTCTG	12	10	15	15	100	9	0,20	<b>0,04</b>	<b>1,80 (0,96-3,34)</b>
GACTA	7	6	6	6	64	6	0,88	0,90	***
ATCTG	3	2	4	4	46	4	0,37	0,61	#
ATTTA	3	2	2	2	14	1	0,60	0,38	#
OTROS (<1%)**	0	0	0	0	22	2		0,84	#

p global (PL vs. PR)= 0,41,  $\chi^2=7,17$ .

**p global (PL vs. Controles)= 0,10,  $\chi^2=13,08$**

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\*En este grupo se incluyen todos los haplotipos encontrados en enfermos y / o controles cuya frecuencia estimada es menos del 1%. \*\*\*Test exacto de Fisher, p a 2 colas. #O.R No valido (uno de los valores esperados es <5). \* PR: Progresión Rápida. PL: Progresión Lenta.

El efecto observado corrobora los resultados a nivel de SNP individual SNPs (rs2796267, rs2724385 y rs859706) y observamos que los 2 haplotipos que muestran asociación a la forma progresiva lenta de EM (uno predisponiendo a ella y el otro de protección) viene marcado por los SNPs que mostraron asociación a nivel individual.

Así, los resultados obtenidos parecen indicar que la variabilidad genética de *CD46* está asociada a la predisposición de EM en un subgrupo concreto de enfermos.

### c) Edad de Debut

Se encontraron diferencias estadísticas en la estratificación de los haplotipos de los afectados de EM por Edad de Debut para uno de los haplotipos mayoritarios (Tabla 21).



Tabla 21. Haplotipos de *CD46* más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM <18 años frente enfermos ≥18 y ≤50 años. Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos <i>CD46</i> Edad de Debut	<18 (N=40)		≥18 ≤50 (N=730)		P
	n	%	n	%	
ATTTA	13	32,5	270	37	0,56
GTCGG	12	30	132	18	<b>0,05</b>
AACTA	6	15	79	11	0,27**
ATCTA	3	7,5	79	11	0,36**
GTCTG	2	5	80	11	0,17**
GACTA	2	5	44	6	0,56**
ATCTG	1	2,5	32	4	0,47**
ATTTA	1	2,5	11	1,5	0,47**
OTROS (<1%)*	0	0	3	0,5	0,85**

p global= 0,63,  $\chi^2 = 6,13$ .

\*En este grupo se incluyen todos los haplotipos encontrados en enfermos y / o controles cuya frecuencia estimada es menos del 1%. \*\*Test exacto de Fisher, p a 2 colas. <18: pacientes con edad inferior a 18 años. ≥18 ≤50: pacientes con edad superior o igual a 18 años e inferior o igual a 50.

Al igual que en el estudio de SNP individual, se realizó la comparación de enfermos con edad de debut clásica frente a controles sin encontrar diferencias significativas (datos no mostrados). La comparación del grupo <18 años frente a controles (adultos), mostró diferencias significativas para el mismo haplotipo que había mostrado asociación para la comparación por grupos de edad (Tabla 22).

Tabla 22. Haplotipo GTCGG de *CD46* frente al resto de haplotipos más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM <18 años a controles. Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipo <i>CD46</i> Edad de Debut	<18 (N=40)		Controles (N=1122)		p	OR (95 %CI)*
	n	%	n	%		
GTCGG	12	30	186	17	<b>0,02</b>	<b>2,16 (1,02-4,51)</b>
Resto Haplotipos	28	70	936	83		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2X2 con 2 grados de libertad.  
<18 : pacientes con edad inferior a 18 años.

Estos resultados son iguales a los encontrados a nivel de SNP, de hecho el rs6657476 (que mostró diferencia a nivel individual) es el que posiblemente esté marcando el efecto del haplotipo GTCGG, que es el único que incluye el alelo minoritario de este SNP. Dado que el

efecto observado es débil, se plantea la necesidad de replicar el efecto observado en una cohorte diferente y ajustada por edad.

#### **d) Resto de estratificaciones**

En la estratificación por clínica, HHV6, género y progresión no se encontraron diferencias significativas (con o sin corrección, datos no mostrados). Esto apoya los resultados obtenidos previamente en los que el *CD46* no parece tener implicación en ninguno de estos tres aspectos de la EM. Aunque no podemos descartar que estos resultados se deban al pequeño tamaño muestral resultante de la estratificación realizada para su análisis.

La potencia estadística de este estudio permite detectar efectos con  $OR=1,40$  para el alelo minoritario, con una probabilidad del 85% y una confianza del 95%. Así, y debido al amplio análisis del *CD46* realizado que comprende un tagging completo del gen, un estudio genotípico y alélico de 5 polimorfismos del *CD46* y de sus variantes haplotípicas, podemos afirmar que el *CD46* parece jugar un papel en el proceso patogénico de esta enfermedad, tanto en algunas de las variables clínicas (condicionando su progresión y edad de debut), como en la susceptibilidad a EM por el *HLA-DRB1\*15:01* (aumentando la susceptibilidad a EM en los pacientes 15:01+).

Se abre así un campo nuevo de estudio del *CD46* en la EM. Este receptor de membrana presenta numerosos ligandos, un efecto en la regulación de LT y del complemento, una capacidad para cambiar la forma celular permitiendo su migración a través de la BHE y es un inductor de la producción de  $IL10^{304}$ . Así, no es de extrañar, que este gen esté implicado en varios aspectos de la EM por sí mismo y no de forma dependiente del HHV6.

### 3. *TNFRSF14*

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad compleja en la que intervienen factores tanto ambientales como genéticos. Uno de los más estudiados en los últimos años han sido los virus. El interés por los virus neurotrópicos se ha incrementado al demostrarse que el daño axonal puede preceder a la desmielinización en la placa de EM<sup>28-30</sup>. Además, se ha encontrado asociación entre las variantes alélicas de otros mediadores de entrada a virus como el Herpes virus entry mediator B (HVEB) y la severidad de la EM<sup>314</sup>. Los virus herpes humanos han sido involucrados con frecuencia en la etiología de la EM<sup>315</sup>. El mecanismo de entrada de los virus es complejo y no completamente dilucidado; parece que aparte de un receptor celular, necesita otras moléculas adicionales que faciliten la entrada<sup>234 235</sup>. Teniendo en cuenta la implicación del HHV6 en la EM<sup>316 317</sup> y la asociación descrita para HVEB con la severidad de la EM<sup>233 314</sup>, es factible pensar que el *TNFRSF14* también cumpla un papel en la etiopatogenia de la EM como mediador de entrada para virus herpes.

Además este receptor desempeña un papel en la regulación de la inmunidad y se ha visto implicado en el desarrollo de la inflamación en la AR<sup>318</sup>, y el aumento de su expresión observado en monocitos en la AR. Esta sobreexpresión podría explicar la diferenciación que sufren éstos hacia osteoclastos a través del estímulo producido por LIGHT en el contexto de la AR<sup>319</sup>. El *TNFRSF14* regula la respuesta inmune en función del ligando que une. Por ejemplo, la unión a LIGHT desempeña un papel importante en la progresión de la inflamación en la sinovial de las articulaciones de pacientes con AR<sup>318-320</sup> y su expresión constitutiva conduce a enfermedades de tipo autoinmune<sup>321</sup>. Un polimorfismo cercano a este gen (a 60Kb) y en alto desequilibrio de ligamiento con él, ha sido asociado a AR en un meta-análisis de dos estudios genome-wide<sup>322</sup> como factor de susceptibilidad que además fue corroborado en una cohorte independiente<sup>323</sup>.

Todo ello nos da una razón añadida a su papel de mediador de entrada de HVS para su estudio en el contexto de la EM. Analizaremos un SNP, que dado el alto desequilibrio de ligamiento de la región, cubre los polimorfismos asociados a AR en el locus *TNFRSF14* (rs10910099 y rs3890745,  $r^2=0,96$ ; OR=0,89)<sup>322</sup>.

Para el estudio de este SNP emplearemos una cohorte ampliada de 1370 pacientes y 1715 controles en las que se incluyen las cohortes de: el Hospital Clínico San Carlos (Madrid), el Hospital Virgen de las Nieves/ Hospital Clínico San Cecilio/ Banco de Sangre (Granada), el Hospital Carlos Haya (Málaga) y el Hospital Virgen Macarena (Sevilla).

### 3.1. Genotipado.

La comparación de las frecuencias genotípicas alélicas y entre portadores del SNP mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario (Tabla 23).

Tabla 23. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas, y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs6684865 de *TNFRSF14* en enfermos de EM y en controles.

<b><i>TNFRSF14</i> rs6684865 A/G</b>		<b>EM (N=591)</b>		<b>Controles (N=806)</b>		<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>		
<b>Genotípicas</b>	<b>GG</b>	126	9	199	12	<b>0,004</b>	<b><math>\chi^2=10,71</math></b>
	<b>AG</b>	535	39	722	42		
	<b>AA</b>	700	51	782	46		
<b>Alélicas</b>	<b>G</b>	787	29	1120	33	<b>0,0008</b>	<b>0,83 (0,74-0,93)</b>
	<b>A</b>	1935	71	2286	67		
	<b>GG+AG</b>	661	49	921	54	<b>0,002</b>	<b>0,80 (0,69-0,93)</b>
	<b>AA</b>	700	51	782	46		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM: Esclerosis Múltiple.

Encontramos asociación entre *TNFRSF14* y EM, de forma que los portadores del alelo minoritario presentan un menor riesgo de desarrollar EM, o lo que es igual, los portadores del alelo común (A) del SNP rs6684865 de *TNFRSF14* presentan un riesgo incrementado de padecer EM con una OR de 1,2 (1,08-1,35).

Aunque, hasta la publicación de este estudio<sup>324</sup>, no se había descrito la asociación de *TNFRSF14* a EM, sí se habían publicado asociaciones de miembros de la familia de los TNFR (*IRF8*, *CD6* y *TNFRSF1A*) tanto con la EM<sup>70</sup> como con otras enfermedades autoinmunes como la EC<sup>310</sup> o la AR<sup>322</sup>.

Los estudios de barrido genómico han identificado recientemente nuevas variantes genéticas que contribuyen al riesgo de EM<sup>17 291</sup>. Sin embargo, el conjunto de todas las asociaciones encontradas sólo explica el 20% de la susceptibilidad a EM<sup>325</sup> y solo algunas de ellas han sido replicadas de forma independiente (*IL2RA*, *IL7R*, *CD58*, *EVI5* o *CLEC16A*). Además, en algunos casos como el de *EVI5*, la asociación encontrada en un estudio de barrido genómico<sup>17</sup> no ha sido hallada en otro<sup>291</sup>. El estricto umbral de significación de estos estudios de alto rendimiento puede dificultar la detección de señales de asociación real en un primer análisis. Incluso factores de susceptibilidad aceptados, como *STAT4* para la AR, fueron inicialmente pasados por alto en los estudios de barrido genómico<sup>326</sup>. Estos hechos pueden explicar que no se haya encontrado asociación a *TNFRSF14* en algún estudio de barrido genómico.

Por otro lado, SNPs situados en la región de *TNFRSF14* y en alto DL con el SNP aquí analizado, sí han mostrado asociación a EM en otros estudios de barrido genómico<sup>326</sup>. Además, el análisis de haplotipos realizado por nosotros<sup>324</sup> junto con los datos adicionales del “International Multiple Sclerosis Genetics Consortium” (IMSGC)<sup>17</sup>, apoyan que la región en la que se sitúa el *TNFRSF14*, sea una región de susceptibilidad para EM.

### **3.2. Estratificación.**

#### **3.2.1. HHV6**

La comparación entre los enfermos infectados por Virus Herpes 6 (HHV6+) y los no infectados (HHV6-) presentaba una significación <0,05 en las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP estudiado (Tabla 24). Se realizó la comparación del grupo HHV6+ frente a los controles, ampliándose la significación (Tabla 24).

Tabla 24. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs6684865 de *TNFRSF14* en enfermos de EM HHV6+ y HHV6- y en controles.

<i>TNFRSF14</i> rs6684865 A/G		HHV6+ (N=82)		HHV6- (N=153)		Controles (N=1703)		HHV6+ vs. HHV6-		HHV6+ vs. Controles	
		n	%	n	%	n	%	P		P	OR(95%CI)*
Genotípicas	GG	7	9	20	13	199	12				
	AG	23	28	64	42	722	42	0,02	$\chi^2=7,17$	0,008	$\chi^2=9,66$
	AA	52	63	69	45	782	46				
Alélicas	G	37	23	104	34	1120	33				
	A	127	77	202	66	2286	67	0,009		0,005	0,59 (0,40-0,88)
	GG+AG	30	37	84	55	921	54	0,007		0,001	0,49 (0,30-0,79)
	AA	52	63	69	45	782	46				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
HHV6+: portadores de Herpes Virus 6. HHV6-: no portadores de Herpes Virus 6.

El HHV6 es uno de los agentes infecciosos barajado como factor ambiental de susceptibilidad a EM (ver introducción). El mediador natural de entrada del HHV6 es el CD46, pero no podemos descartar que existan otras moléculas con efecto coadyuvante para la acción de este virus neurotrópico. Una de estas moléculas podría ser el *TNFRSF14* que es un mediador de entrada a los HVS (familia a la que pertenece HHV6), más si tenemos en cuenta que HHV6 podría provocar la redistribución de otras moléculas celulares potencialmente relacionadas con su entrada.

Estos resultados sugieren que el *TNFRSF14* está relacionado con la infección activa por HHV6 en pacientes con EM, confiriendo un riesgo incrementado (OR=2,04) a EM en los portadores del alelo mayoritario. Estos resultados abren un amplio campo para el estudio funcional de la relación entre *TNFRSF14* y HHV6 y la implicación en el desarrollo de la EM que ésta pudiera tener.

### 3.2.2. Resto de estratificaciones

Estratificamos nuestra población en función de las otras características analizadas en esta tesis.

Aunque tanto la forma clínica, la edad de debut o la progresión de EM se han relacionado con diferentes virus, sugiriendo que el *TNFRSF14* pudiera estar implicado en alguno de estos aspectos de la EM, no parece que el *TNFRSF14* esté implicado en ninguno de

ellos. Este hecho se ha observado también en la AR, en la que a pesar de ser un factor de susceptibilidad no ha mostrado ser un factor predictivo mejor que las variables clínicas utilizadas en relación con el curso clínico de la misma<sup>327</sup>

Se ha visto que el *TNFRSF14* contribuye a la diferencia de incidencia por sexo en el LES<sup>328</sup> cuyo ratio, como el de la EM, es de mayor incidencia en mujeres. Sin embargo, estos resultados se han observado a nivel funcional (aumento de expresión génica), pero no en relación a la variabilidad del gen que hemos comprobado que no está relacionada con esta diferencia de género en la EM.

## 4. *TNFRSF6B*

Este receptor ha sido barajado como el candidato más factible a estar asociado a EII pediátrica dentro del bloque de desequilibrio de ligamiento situado en 20q13. Esta teoría se halla apoyada por la diferencia en la expresión de mRNA de este gen en las biopsias de colon de pacientes con EII frente a controles, sin que existan diferencias en la expresión de los otros genes del bloque 20q13<sup>310 329</sup> entre estas poblaciones. Estos resultados concuerdan con estudios previos acerca del aumento de expresión de *TNFRSF6B* en LT en la mucosa inflamada de pacientes con CU<sup>330</sup> y en inflamación aguda del epitelio intestinal<sup>331</sup>.

Por otro lado, un polimorfismo próximo a este gen (rs4809330) se ha relacionado con la susceptibilidad conferida a AR<sup>332</sup> y recientes barridos genómicos parecen relacionarlo con la susceptibilidad a EII pediátrica<sup>333</sup>.

Su acción ha sido también observada en la EAE, donde la administración intratecal de *TNFRSF6B* a ratones afectos de EAE ha provocado una mejora en la sintomatología (reducción en la escala de evaluación clínica y menor inflamación de la médula espinal), reduce la producción de IL-17, IFN $\gamma$  y TNF-alfa y aumenta la de IL-4 por parte de los LT CD4+<sup>334</sup>. Además, inhibe la glicoproteína de mielina específica de oligodendrocitos (MOG) específica de la proliferación de LT, sugiriendo todo ello un efecto inhibitor de la inflamación del SNC por parte de *TNFRSF6B*, de forma directa o a través de la supresión de las células Th17. Así, podría ser una buena alternativa terapéutica<sup>335</sup>. Además, en otras enfermedades del SNC, se ha observado su implicación en la modulación de la respuesta Th17 bloqueando la interacción Fas-FasL<sup>336</sup>.

Existen muchos datos que hacen interesante el estudio de *TNFRSF6B* en el contexto de la EM, principalmente al haber mostrado relación con la EII y la AR.

### 4.1. Genotipado.

Para el genotipado del SNP de *TNFRSF6B* seleccionado, emplearemos una cohorte ampliada de 1370 pacientes y 1715 controles en las que se incluyen las cohortes de: el



Hospital Clínico San Carlos (Madrid) (cohorte empleada en esta tesis), el Hospital Virgen de las Nieves/ Hospital Clínico San Cecilio/ Banco de Sangre (Granada), el Hospital Carlos Haya (Málaga) y Hospital Virgen Macarena (Sevilla). Para el estudio de estratificación sólo disponemos de la cohorte del Hospital Clínico San Carlos (Madrid),

La comparación de las frecuencias genotípicas mostró tendencia a la significación, mientras que la comparación de frecuencias alélicas y entre portadores del alelo minoritario, mostró diferencias significativas (Tabla 25).

Tabla 25. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs4809330 de *TNFRSF6B* en enfermos de EM y en controles.

EM/Controles		EM (N=1367)		Controles (N=1710)		p	OR (95 %CI)
<i>TNFRSF6B</i>		n	%	n	%		
rs4809330 G/A	AA	130	9	145	8	0,07	$\chi^2=5,06$
	GA	560	41	649	38		
	GG	677	50	916	54		
Genotípicas							
Alélicas	A	820	30	939	27	0,02	1,13 (1,01-1,27)
	G	1914	70	2481	73		
	AA+GA	690	50	794	46	0,02	1,18 (1,02-1,36)
	GG	677	50	916	54		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

EM: Esclerosis Múltiple.

La asociación aquí encontrada ha sido recientemente publicada<sup>324</sup>. Esta asociación de predisposición a la EM es de efecto similar opuesto al encontrado en EII<sup>310</sup>. Este hecho es similar al descrito para CD40 C/T-1, que muestra predisposición a AR y enfermedad de Graves, mientras que para EM ejerce un efecto protector<sup>70</sup>. De hecho, algunos de los loci de susceptibilidad a la EM, con funciones inmunes, tienen un papel en otras enfermedades inflamatorias. Esto apoya la teoría de fenómenos de desregulación del SI contrapuestos en distintas enfermedades autoinmunes.

Hasta la fecha, ninguno de los estudios de barrido genómico ha encontrado relación entre la región 20q13 y la EM. Sin embargo, este hecho puede deberse a los mismo factores limitantes de los barridos genómicos expuestos previamente para el *TNFRSF14*. Además, la baja asociación aquí encontrada (OR=1,13), puede explicar que el efecto fuese desestimado en un primer análisis de los estudios de barrido genómico.

En cualquier caso, el *TNFRSF6B* parece estar asociado a la predisposición a EM y sería conveniente un estudio en profundidad del mismo a nivel funcional para determinar su implicación en la EM:

## 4.2. Estratificación.

### 4.2.1. Forma Clínica

La comparación entre enfermos PP y No PP no mostró diferencias genotípicas significativas (aunque sí tendencia a la significación), pero si alélicas y entre carriers para el SNP estudiado (Tabla 26), por ello se realizó la comparación del grupo de los PP frente a los controles (Tabla 26), manteniéndose la significación a nivel alélico y entre carriers y mostrando significación a nivel genotípico. La comparación entre No PP y controles no mostró diferencias a ningún nivel (datos no mostrados).

Tabla 26. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs4809330 de *TNFRSF6B* en enfermos de EM estratificados por forma clínica y en controles.

<i>TNFRSF6B</i> rs4809330 G/ A		PP (N=44)		No PP (N=434)		Controles (N=805)		PP vs. No PP		PP vs. Controles	
		n	%	n	%	n	%	p		p	OR (95%CI)*
Genotípicas	AA	6	14	42	10	73	9				
	GA	24	55	176	41	327	41	0,07	$\chi^2=5,17$	0,05	$\chi^2=5,78$
	GG	14	31	216	50	405	50				
Alélicas	A	36	41	260	70	473	29				
	G	52	59	608	30	1137	71	0,03		0,02	1,66 (1,05-2,63)
	AA+GA	30	68	218	50	400	50	0,02		0,01	2,17 (1,19-4,37)
	GG	14	32	216	50	405	50				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

PP: afectados de EM con forma clínica Primaria Progresiva.

La predisposición aquí encontrada a padecer una forma severa de EM en los portadores del alelo minoritario (OR=2,17) está apoyada por hechos como: el papel de *TNFRSF6B* en el desarrollo clínico de la EAE<sup>334</sup> o su acción como modulador de la respuesta inflamatoria en el SNC<sup>336</sup>. Además, en la EII está aumentado y se sospecha que esto agrava el proceso inflamatorio<sup>337</sup>.

Por otro lado, se sabe que sus niveles están aumentados en el SNC de pacientes con EM<sup>335</sup>. Aunque las implicaciones de este hecho no están claras<sup>335 338</sup>, la predisposición para

una forma más agresiva de EM está a favor del efecto promotor de la producción de IL-4<sup>334</sup> ejercido por el *TNFRSF6B*.

No podemos olvidar que a medida que se han ido encontrando nuevos factores genéticos de susceptibilidad, se ha empezado a considerar<sup>17 129</sup> que estos factores pueden ser diferentes entre unos grupos de pacientes y otros<sup>17 138</sup>. Es posible que el efecto observado de predisposición a EM de los portadores del alelo minoritario se deba principalmente al grupo de pacientes PP, y que sea en ellos donde el *TNFRSF6B* ejerza el efecto de susceptibilidad no solo a la enfermedad, sino a una forma severa de la misma.

#### 4.2.2. Resto de estratificaciones

La comparación entre los grupos de cada una de las clasificaciones no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario para el SNP (datos no mostrados). No se ha descrito, hasta el momento, asociación entre *TNFRSF6B* y ninguno de características de la EM (salvo el efecto sobre la forma clínica previamente descrita). Sin embargo, el papel de *TNFRSF6B* en la EM ha sido muy poco estudiado, y quizá habría que ampliar los campos de análisis antes de descartar definitivamente la implicación de este gen en alguno de los aspectos de la EM.

#### 4.3. Interacción entre *TNFRSF14* y *TNFRSF6B*

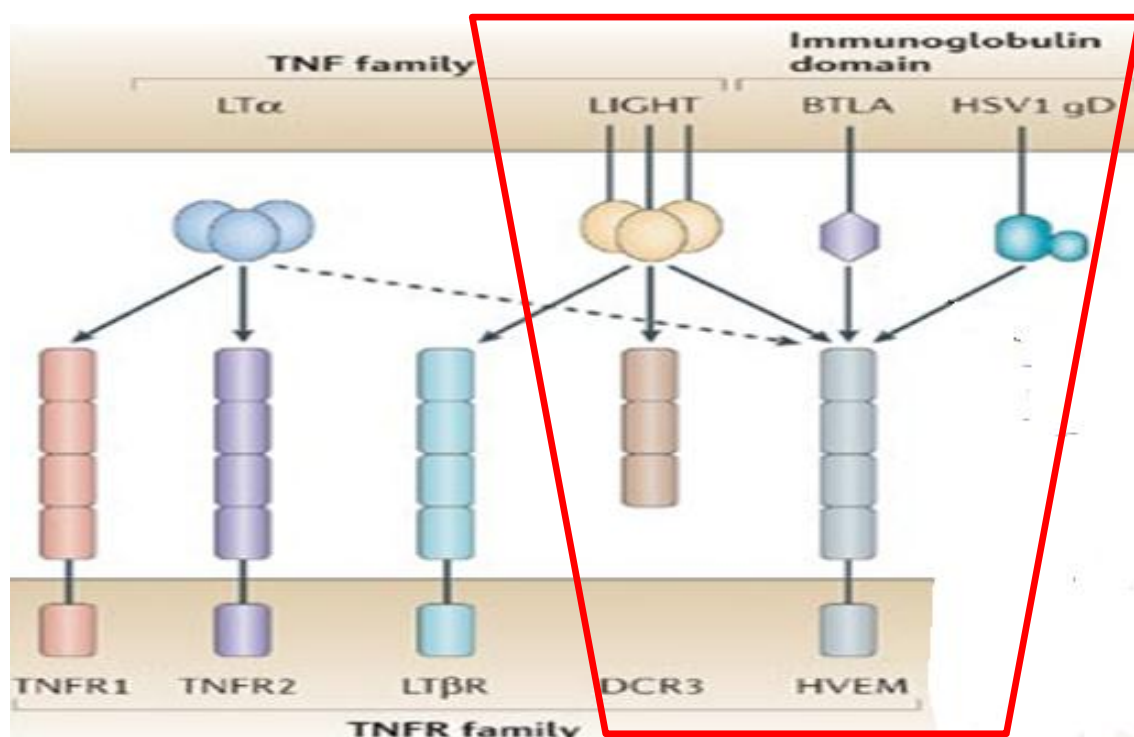
Muchos estudios epidemiológicos plantean la co-ocurrencia de enfermedades autoinmunes<sup>339-341</sup> y otros tantos apuntan a la evidencia, cada vez mayor, de asociación genética compartida entre numerosas enfermedades autoinmunes<sup>342-344</sup>, sugiriéndose así la existencia de vías etiopatogénicas comunes. Sin embargo, el estudio en profundidad de los complejos mecanismos genéticos que subyacen en los diferentes fenotipos autoinmunes está aún en proceso.

Sabemos que tanto el *TNFRSF14* como el *TNFRSF6B*, contribuyen al equilibrio inmune controlando la activación de LT. Estos miembros de la *TNFRSF* comparten el ligando LIGHT presentando una unión competitiva<sup>239</sup>. Se ha observado recientemente que existe una forma de

LIGHT (heterotrímero) que presenta menor avidéz por TNFRSF6B<sup>345</sup>. Así, se reduce significativamente el efecto inhibitor de TNFRSF6B sobre la activación de la inflamación inducida por su unión a HVEM. Queda así patente la interacción entre estos 2 receptores en la regulación del proceso inflamatorio (Fig. 31).

Esta interacción a nivel funcional se ha observado también a nivel genético en la AR<sup>332</sup>, lo que hace interesante comprobar si este efecto compartido ocurre también en la EM.

Se estudiaron los mismos SNPs empleados en el estudio de AR y que han mostrado asociación a EM y a otras enfermedades autoinmunes<sup>329 332</sup>.



**Fig. 31.** Relación de los ligandos de HVEM y DcR3 HVEM -TNFRSF14- (Herpes Virus Entry Mediator) y DcR3 -TNFRSF6B- (Decoy Receptor 3). Ligando común LIGHT (ligand for herpesvirus entry mediator) y ligandos de HVEM: BTLA (Immunoglobuline superfamily members B and T lymphocyte attenuator) y HSV1 gD (envuelta glicoproteica D (gD) del virus Herpes Simple)<sup>346</sup>. (Señalados en rojo).

Al estratificar la población de EM y controles por genotipo GG y genotipo no GG para el SNP de *TNFRSF6B* rs4809330, y enfrentarla a la estratificación por los genotipos, alelos y portadores del alelo minoritario del rs6684865 del *TNFRSF14*, se observa que ser portador del alelo de mayor frecuencia de rs6684865 del *TNFRSF14* y del alelo de menor frecuencia de *TNFRSF6B* confiere predisposición a EM (Tablas 27 y 28).

Tabla 27. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP rs6684865 de *TNFRSF14* en enfermos de EM y en controles estratificados por portadores de A (GA+AA) y no portadores A (GG) del SNP rs4809330 de *TNFRSF6B*. (Población de Madrid).

<b><i>TNFRSF14</i> rs6684865 A/G</b>									
<b><i>TNFRSF6B</i> rs4809330 G/A</b>	<b>Genotipo</b>			<b>p</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>Alelo</b>		<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>			<b>G</b>	<b>A</b>		
<b>EM GG</b>	120	121	27	0,46	1,52	361	175	0,94	0,99 (0,78-1,26)
<b>Cont. GG</b>	186	175	54			547	263		
<b>EM GA+AA</b>	148	106	33	0,03	6,76	402	172	0,05	1,25 (0,99-1,59)
<b>Cont. GA+ AA</b>	168	185	47			521	279		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 28. Comparación de las frecuencias de portadores para el SNP analizado en *TNFRSF14* rs6684865 en enfermos de EM y en controles estratificados por portadores de A (GA+AA) y no portadores A (GG) del SNP rs4809330 de *TNFRSF6B*. (Población de Madrid).

<b><i>TNFRSF14</i> rs6684865 A/G</b>				
<b><i>TNFRSF6B</i> rs4809330 G/A</b>	<b>GG</b>	<b>GA+AA</b>	<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
<b>EM GA+AA</b>	148	139	0,01	1,47 (1,07-2,02)
<b>Cont GA+AA</b>	168	252		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM= Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

En vista de este resultado, se extendió el estudio a la cohorte ampliada de 1370 pacientes y 1715 controles (Tablas 29 y 30), para comprobar si el efecto observado se replicaba.

Tabla 29. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP analizado en *TNFRSF14* rs6684865 en enfermos de EM y en Controles estratificados por portadores de A (GA+AA) y no portadores A (GG) del SNP rs4809330 de *TNFRSF6B*. (Cohorte ampliada).

<b><i>TNFRSF14</i> rs6684865 A/G</b>									
<b><i>TNFRSF6B</i> rs4809330 G/A</b>	<b>Genotipo</b>			<b>p</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>Alelo</b>		<b>EM vs. Controles</b>	
	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>			<b>G</b>	<b>A</b>	<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
<b>EM GG</b>	331	259	62	0,35	2,05	921	383	0,14	1,12 (0,96-1,32)
<b>Cont GG</b>	425	373	99			1223	571		
<b>EM GA+AA</b>	344	261	58	0,003	11,41	949	377	0,00006	1,32 (1,12-1,55)
<b>Cont. GA+ AA</b>	340	347	95			1027	537		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM= Esclerosis Múltiple. Cont: controles.

Tabla 30. Comparación de las frecuencias de portadores para el SNP analizado en *TNFRSF14* rs6684865 en enfermos de Esclerosis Múltiple y en Controles estratificados por portadores de A (GA+AA) y no portadores A (GG) del SNP rs4809330 de *TNFRSF6B*. (Cohorte ampliada).

<b><i>TNFRSF14</i> rs6684865 A/G</b>				
<b><i>TNFRSF6B</i> rs4809330 G/A</b>	<b>GG</b>	<b>GA+AA</b>	<b>P</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
<b>EM GA+AA</b>	344	319	<b>0,001</b>	<b>1,40 (1,13-1,74)</b>
<b>Cont. GA+AA</b>	340	442		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM= Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

La EM es una enfermedad compleja y aunque se han publicado algunos factores de riesgo genético, estos explican una parte muy pequeña de la heredabilidad de la EM<sup>325</sup>.

El efecto de las variantes genéticas puede verse influenciado por el medioambiente pero también por otros genes, haciendo que ciertos efectos sólo sean observados, o se hagan mayores, en determinados grupos de pacientes. Así, se han realizado estudios de epistasis entre genes, para determinar la presencia de efectos combinados. Siendo la epistasis entre *HLA-DRB1\*15:01* y otros genes la más estudiada, y donde se han encontrado asociaciones que apoyan la idea de efecto compartido entre genes<sup>120 308 309 347</sup>.

Se sabe que la ruta de TNF es importante en la patogenia de la EI<sup>348</sup>. Pero quizá, más importantes son algunas de las características de LIGHT (receptor compartido de *TNFRSF14* y *TNFRSF6B*). Este se expresa en células dendríticas, su expresión constitutiva conduce a enfermedades autoinmunes<sup>321</sup>, y existe una forma de LIGHT que presenta menor avidez por *TNFRSF6B* reduciendo así su efecto inhibitor sobre la unión HVEM-LIGHT<sup>345</sup> (con efecto proinflamatorio). Estos hechos concuerdan con un mayor efecto de predisposición para EM en los pacientes que el alelo mayoritario (A) de *TNFRSF14* y que además portan el alelo de susceptibilidad de *TNFRSF6B*<sup>324</sup>. Observamos que el efecto conjunto de ambos alelos de susceptibilidad, provoca mayor susceptibilidad a EM que el efecto individual de cada uno (*TNFRSF14* OR=1,2, *TNFRSF6B* OR=1,18, efecto combinado OR=1,32) y que este efecto aumenta al ampliar la cohorte de estudio (cohorte Madrid: OR=1,25, p=0,05 y cohorte ampliada OR=1,32, p<10<sup>-4</sup>).

Se abre así un abanico de cuestiones a resolver tanto en la función individual de estos miembros de la familia de los TNFR, como en la interacción entre los mismos.

## 5. CD40

El gen *CD40* se ha asociado con la AR<sup>322</sup>; la frecuencia de su polimorfismo rs4810485 (localizado en el 2º intrón del gen) está disminuida en pacientes con AR frente a controles. Este SNP es prácticamente equivalente al situado en la posición -1 del ATG [C/T(-1)], en una secuencia Kozak, imprescindible para el inicio de la traducción en vertebrados<sup>349</sup>. Se ha observado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el alelo de mayor frecuencia del SNP situado en -1 aumenta la eficiencia de la traducción del *CD40* en un 15-32% respecto a los portadores del alelo de menor frecuencia<sup>350</sup>. De hecho, se ha medido la diferencia de expresión para ambas formas de *CD40*, presentando la forma mutada una reducción muy significativa de la expresión ( $p=0,0007$ )<sup>351</sup>. También se ha descrito la asociación de este SNP a la enfermedad de Graves (asociación replicada en varias poblaciones<sup>352-354</sup>).

La acción del CD40 es crítica en muchos estados autoinmunes experimentales como: la AR inducida por colágeno<sup>355</sup>, la enfermedad de Graves experimental<sup>356</sup>, la Colitis Ulcerosa y la EAE<sup>357</sup>, en las que la presencia de Ac antiCD40 disminuye su severidad, y en las lesiones de la EC en las que existe sobreexpresión de CD40<sup>358</sup>. Sin embargo, no ha presentado relación con otras enfermedades de estirpe autoinmune como: el LES<sup>359</sup> o la DM 1<sup>360</sup>.

Por otro lado, el CD40 presenta acciones a nivel cerebral. Así, la interacción CD40/CD40LG es imprescindible para la activación, inducida por proteína beta-amiloide, de la microglía, hecho considerado como uno de los procesos tempranos en el desarrollo de Alzheimer<sup>361</sup>. Los ratones carentes de CD40 (*CD40<sup>-/-</sup>*) son resistentes a la EAE<sup>362</sup>. El tratamiento con Ac anti-CD40 en los monos titis previene y disminuye<sup>363 364</sup> la sintomatología del modelo de EAE en ellos<sup>365</sup>. Además, recientemente se ha visto que es un elemento clave para la diferenciación de Th17<sup>52</sup>.

### 5.1. Genotipado.

La comparación de las frecuencias alélicas y entre portadores del alelo minoritario, mostró diferencias significativas para el SNP rs1883832. La comparación de frecuencias genotípicas mostró tendencia a la significación (Tabla 31).

Tabla 31. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP rs1883832 de *CD40* en enfermos de EM y en controles.

<b>CD40 rs1883832 C/T</b>		<b>EM (N=495)</b>		<b>Controles (N=788)</b>		<b>p</b>	<b>OR (95 %CI)*</b>
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>		
<b>Genotípicas</b>	<b>TT</b>	44	9	65	8	<b>0,06</b>	$\chi^2=5,49$
	<b>TC</b>	215	43	295	37		
	<b>CC</b>	236	48	428	54		
<b>Alélicas</b>	<b>T</b>	303	31	425	27	<b>0,04</b>	<b>1,19 (1,00-1,43)</b>
	<b>C</b>	687	69	1151	73		
	<b>TT+TC</b>	259	52	360	46	<b>0,02</b>	<b>1,30 (1,03-1,65)</b>
	<b>CC</b>	236	48	428	54		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM: Esclerosis Múltiple.

Estos datos corroboran los resultados previamente encontrados<sup>366</sup>, en los que se observaba un incremento en la frecuencia del alelo minoritario de [C/T(-1)], en pacientes respecto a controles. El estudio previamente publicado<sup>366</sup> no alcanzaba significación estadística, probablemente debido al pequeño tamaño muestral de que partía. A pesar de este hecho, el análisis combinado de ambos datos, mediante Mantel-Haenszel, alcanza significación estadística y corrobora el efecto observado con anterioridad<sup>366</sup> [p=0,01; OR (95% CI)= 1,20 (1,03-1,41)]. Además, este resultado se ve sustentado por estudios de barrido genómico que también encuentran asociación entre *CD40* y EM<sup>325</sup>.

Este efecto ha sido observado también en la EC tanto en un estudio de barrido genómico<sup>310</sup> como en una cohorte independiente<sup>103</sup>. Sin embargo, este mismo polimorfismo ha mostrado un efecto contrario en la predisposición a UC<sup>103</sup> y AR<sup>322 367</sup>. Sin embargo, este fenómeno, ha sido observado para otros SNPs en el contexto de enfermedades autoinmunes, tal es el caso del rs2476601 del gen *PTPN22*, con efecto contrario en IBD y DM1<sup>368</sup>.

Podemos deducir de este estudio que el rs1883832 del *CD40* está asociado con la susceptibilidad a EM, y dada su función, podemos anticipar podría ser la verdadera variante causal del incremento de susceptibilidad a EM provocado por *CD40*.

En cualquier caso, a la vista de los resultados genéticos se plantea la necesidad de un estudio de los mecanismos por los cuales el *CD40* actúa sobre el SI, tanto en la EM como en el resto de las enfermedades autoinmunes en las que ha sido implicado.



## 5.2. Estratificación

### 5.2.1. Forma Clínica

Se ha observado que las células inmunes de los pacientes RR secretan neurotrofinas. Esta secreción se ve alterada al estimular las células a través de CD40, pero al bloquear CD40 mediante Ac se produce un aumento en la expresión de neurotrofinas<sup>369</sup>. Por tanto, se podría pensar que el CD40 estuviera también implicado en la forma clínica de la EM.

La comparación entre enfermos que presenta la forma clínica PP y los que no (No PP), mostró una tendencia a la significación estadística en la comparación de frecuencias genotípicas y diferencias significativas de las frecuencias alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el SNP analizado (Tabla 32).

Tabla 32. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre carriers para el SNP rs1883832 analizado de *CD40* en enfermos de EM estratificados por forma clínica.

CD40 rs1883832 C/T		PP (N=43)		No PP (N=415)		p	
		n	%	n	%		
Genotípicas	TT	1	2	39	9	0,08	$\chi^2=4,83$
	TC	15	35	180	44		
	CC	27	63	196	47		
Alélicas	T	17	20	258	31	0,02	
	C	69	80	572	69		
	TT+TC	16	37	219	52	0,05	
	CC	27	63	196	48		

PP: Afectos de EM con forma clínica Primaria Progresiva. No PP: Afectos de EM con forma clínica diferente de la Primaria Progresiva

Sin embargo, esta significación no se mantenía al enfrentar a los pacientes PP frente a los controles, ni al enfrentar a pacientes No PP frente a controles (datos no mostrados). Este hecho es similar al encontrado en un estudio del barrido genómico en el que se describe la asociación entre EM y *CD40*, pero la asociación encontrada entre los polimorfismos analizados (con  $r^2=0,95$  al rs1883832) y las formas clínicas de EM<sup>370</sup>, es débil. A pesar de ello, el análisis combinado (de PP frente a RR), mediante Mantel-Haenszel, de ambas cohortes, alcanza significación estadística  $p=0,005$  [OR=0,57 (0,38-0,85)], corroborando así la asociación entre

CD40 y la forma clínica de EM. Esta asociación se ve apoyada por la relevancia demostrada de CD40 en el proceso clínico de los modelos animales de EM<sup>362-365</sup>.

### 5.2.2. Resto de Estratificaciones

Teniendo en cuenta la gran implicación del CD40 en el proceso autoinmune, no sería de extrañar que tuviera asociación con alguna característica de la enfermedad. Sin embargo, la comparación entre los grupos de cada una de las clasificaciones no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario para el SNP estudiado (datos no mostrados). Estos resultados corroboran los del estudio realizado por Jensen *et al* 2010<sup>370</sup>, que al igual que el nuestro, evaluaba si el SNP asociado a EM estaba implicado en distintos aspectos de esta enfermedad, sin encontrar asociación alguna entre el SNP y las características de EM analizadas<sup>370</sup>.

## 6. IL27

Los ratones que no expresan el receptor de IL-27 son especialmente susceptibles a la EAE. Existe en ellos un aumento de la desmielinización y de la inflamación, pero también una mayor producción de células Th17, deduciéndose un efecto supresor de la IL-27 sobre la diferenciación hacia Th17<sup>371 372</sup>. Este efecto es ejercido a través de STAT1, mientras que la subunidad 28 de IL-27 por sí misma es capaz de inhibir la producción de IL-17 por LTCD4+ y LTCD8+. Por otro, la administración de Ac anti-IL-27 a ratones EAE cura la enfermedad<sup>373</sup>, hecho que parece contradecir el efecto supresor de IL-27. Sin embargo, en la AR la IL-27 ha demostrado un doble efecto; por un lado atenúa la enfermedad en ratones con artritis inducida por colágeno<sup>374</sup>, mientras que en el modelo murino de AR inducida por proteoglicano puede favorecer la respuesta de Th1 y la susceptibilidad a AR<sup>375</sup>.

Aparte de su efecto sobre la EAE, se ha visto que inhibe el proceso de inflamación de la microglía<sup>376</sup>. El gen *IL27* ha mostrado asociación con varias enfermedades autoinmunes. En varios estudios de barrido genómico, se ha descrito su asociación a la predisposición a DM1<sup>377</sup>, efecto recientemente replicado en un estudio independiente<sup>378</sup>. Efecto contrario al observado en la EII<sup>368</sup>, aunque también se ha relacionado con la susceptibilidad a la forma pediátrica de esta enfermedad<sup>333</sup> y se ha visto que promueve la colitis inducida por LT en ratones<sup>379</sup>.

Dados los efectos conocidos de IL-27 en las enfermedades autoinmunes, la presencia de asociación genética a las mismas y que el IFN $\beta$  regula la producción de IL-27 con un papel crítico inmunorregulador en las enfermedades autoinmunes del SNC<sup>372</sup>, se hace evidente la importancia del estudio de este gen en el contexto de la EM.

### 6.1. Genotipado

La comparación de las frecuencias genotípicas alélicas y entre portadores del alelo minoritario, no mostró diferencias significativas para el SNP analizado (rs9550642) (Tabla 33).

Tabla 33. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y portadores del alelo minoritario para el SNP rs9550642 de *IL27* en enfermos de EM y en Controles.

<i>IL27</i> rs9550642 A/G		EM (N=495)		Controles (N=915)		p	OR (95 %CI)*
		n	%	N	%		
Genotípicas	GG	7	1	9	1	0,82	$\chi^2=0,39$
	AG	70	14	119	15		
	AA	418	85	659	84		
Alélicas	G	84	8	137	9	0,84	0,97 (0,72-1,30)
	A	906	92	1437	91		
	GG+AG	77	16	128	16	0,73	0,95 (0,69-,31)
	AA	418	84	659	84		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM= Esclerosis Múltiple.

## 6.2. Estratificación

La distribución dentro de cada una de las subclasificaciones es similar para controles y enfermos (datos no mostrados).

La *IL-27* parece desempeñar un papel importante a nivel funcional en la EAE. Sin embargo, no hemos encontrado asociación entre este gen y ninguno de los aspectos de la EM analizados en esta tesis. Este hecho es similar al observado en la AR, en la que *IL-27* tiene efecto a nivel funcional<sup>374 375</sup> en ratones, pero hasta la fecha no se ha descrito relación a nivel genético en humanos.

La relación establecida por estudios de barrido genómico entre *IL-27* y otras enfermedades autoinmunes<sup>368</sup> recae en los rs4788084 y rs8049439, polimorfismos situados en la región 16p11.2, relativamente cerca de *IL27*, a 44kb y 410kb respectivamente (el *IL27* está situado entre ambos SNPs), lo que ha hecho pensar que el efecto observado se debía a *IL27*. Sin embargo, existen otros genes en esta región cuya relación con enfermedades autoinmunes no ha sido estudiada, como es el caso de *NUPR1* y *CD19*, este último responsable de enfermedades de estirpe inmune con causa genética conocida, la Inmunodeficiencia Común Variable.

Por otro lado a pesar de que los estudios de barrido genómico han encontrado asociación entre este gen y otras enfermedades autoinmunes, esta asociación no ha sido descrita para la EM.

Sin embargo, dado que los estudios de barrido genómico solo explican una pequeña parte de la heredabilidad estimada para EM, que el SNP analizado en esta tesis está situado a aproximadamente 7,6Mb de *IL27*, y que *IL27* ha mostrado asociación con la EII, tanto a nivel de SNP (g.-964A>G) como haplotípico<sup>380</sup>; sería conveniente un estudio más amplio de esta región cromosómica y en particular de *IL27* para confirmar que su variabilidad genética no está asociada a la EM y sí a otras enfermedades autoinmunes.

## 7. Foxp3

El estado de hiperactividad de los LT se asocia a enfermedades autoinmunes. Se conocen varios genes reguladores de la función y activación de Treg. El Foxp3 tiene capacidad de suprimir estos genes, de lo que se deduce que una de sus principales acciones es mantener el normal funcionamiento de Treg<sup>381</sup>. Foxp3 también activa genes, de forma que regula el linaje de los LT durante la diferenciación, proliferación y acción periférica de los mismos, en base a diferentes subprogramas de transcripción (represores/activadores)<sup>382</sup>. Se ha observado que LT CD4+/Foxp3+ supresores pueden transformarse en linfocitos Th<sup>383</sup>. Foxp3 (como otros miembros de su familia) se une a la región promotora de *IL2* con acción supresora, pero además en los LT naïve es capaz de provocar la supresión de la expresión de IL-4 e IFN $\gamma$ , al inhibir NF $\kappa$ B y NFAT<sup>384</sup>. La acción sobre NFAT y NF $\kappa$ B en LT maduros se observa también por la incapacidad de desarrollar EAE en ratones cuyos LT autorreactivos eran transducidos con Foxp3<sup>384</sup>.

En la EM existen alteraciones en la expresión de Foxp3 en las Treg a nivel periférico<sup>87</sup>. El tratamiento de la EM con COP-1 (Copolimero 1) provoca en los pacientes un aumento de la expresión de Foxp3 en LT CD4+ e induce la transformación de estos LT hacia Treg (CD4+/CD25+), acción mediada por IFN $\gamma$ <sup>385</sup>.

En la EC existe disminución de Treg Foxp3+ en la mucosa intestinal respecto de controles<sup>386</sup>. Sin embargo, tras el tratamiento con TFN $\alpha$  se produce un aumento de las mismas<sup>387</sup>.

Datos como la supresión de la producción de IL-17 por Th17 en ratones EAE tratados con IFN $\beta$  al retirar las Treg<sup>388</sup>, hacen pensar que existe una interacción entre las células Foxp3+ y las células Th17, interacción que podría estar desempeñando un papel importante en la EM<sup>389</sup>. De hecho, parece que Treg Foxp3+ regulan la acción de Th17 suprimiendo su acción patogénica<sup>55</sup>. Esta alteración del balance Th17/Treg Foxp3 ha sido observado también en la AR<sup>390</sup>.

En las personas infectadas con HTLV-1 (Virus humano linfotrófico-T), retrovirus capaz de provocar inflamación del SNC, existe mayor proporción de células Foxp3+. Estas células

Foxp3+ podrían estar ejerciendo un efecto de retardo de progresión de la inflamación y contribuyendo a la supresión inmunitaria de HTLV-1<sup>391</sup>.

Se ha visto reducción en la expresión de Foxp3 en LES y AR<sup>392</sup> y varios autores han observado que existe una disfunción de las Treg Foxp3+ en la EM<sup>86 306</sup>, disfunción observada también en otras patologías autoinmunes como DM1<sup>393</sup>, AR<sup>394</sup> y EII<sup>395</sup>. Además, estas células son capaces de suprimir la inflamación crónica de estos procesos en modelos animales<sup>396</sup>.

La relación entre Foxp3 y la autoinmunidad no ha sido descrita solo a nivel funcional, sino que se ha encontrado asociación entre SNPs de este gen y diversas patologías autoinmunes como la psoriasis<sup>397</sup> o el LES<sup>398</sup>, pero no en otras como la enfermedad de Graves<sup>399</sup>, la EC<sup>400</sup> o la AR<sup>401</sup>. En la DM1 no parece ser factor de susceptibilidad<sup>402</sup>, pero sí se asocia a la forma clínica de DM1<sup>403</sup>.

En cualquier caso, a pesar de la evidencia funcional de la relación entre Foxp3 y la EM (tanto a nivel de respuesta a tratamiento como en la etiopatogenia) no existe ningún trabajo que analice esta relación a nivel de variabilidad genética de *Foxp3*.

### 7.1. Genotipado.

El genotipado se realizó en 3 SNPs y 1 microsatélite que abarcan más del 85% de la variabilidad del gen.

Debido a que este gen se halla en el cromosoma X hubo que analizar a los hombres y mujeres por separado.

En el grupo de las mujeres, la comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario y del alelo frecuente, de afectas de EM frente a controles, mostraron diferencias significativas para 2 de los SNPs (Tablas 34 - 37). En los hombres las frecuencias alélicas no mostraron diferencias significativas entre afectados de EM y controles (datos no mostrados).

Tabla 34. Comparación de las frecuencias genotípicas para cada uno de los 3 SNPs analizados de *Foxp3* en mujeres con EM y en controles.

SNPs <i>Foxp3</i> Mujeres	11		12		22		p	Chi cuadrado
	EM	Cont	EM	Cont	EM	Cont		
rs2294020 1=G; 2=A	185 (59%)	239 (57%)	109 (34%)	157 (37%)	22 (7%)	23 (5%)	0,56	1,15
rs228083 1=T; 2=C	89 (28%)	104 (25%)	139 (44%)	224 (53%)	88 (28%)	91 (22%)	<b>0,03</b>	<b>6,82</b>
rs4824747 1=G; 2=T	269 (85%)	320 (77%)	41 (13%)	89 (21%)	5 (2%)	7 (2%)	<b>0,01</b>	<b>8,68</b>

EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 35. Comparación de las frecuencias alélicas para cada uno de los 3 SNPs analizados de *Foxp3* en mujeres con EM y en controles.

SNPs <i>Foxp3</i> Mujeres	1	1	2	2	p	OR (95 %CI)*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
rs2294020 1=G; 2=A	479 (76%)	635 (76%)	153 (24%)	203 (24%)	0,99	1,00 (0,78-1,28)
rs228083 1=T; 2=C	317 (50%)	432 (52%)	315 (50%)	406 (48%)	0,59	1,06 (0,86-1,31)
rs4824747 1=G; 2=T	579 (92%)	729 (88%)	51 (8%)	103 (12%)	<b>0,008</b>	<b>0,62 (0,43-0,90)</b>

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad. EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 36. Comparación de las frecuencias de portadores del alelo frecuente para cada uno de los tres polimorfismos analizados en *Foxp3* en mujeres con EM y en controles mujeres.

SNPs <i>Foxp3</i> Mujeres	Portador 1	Portador 1	No Portador 1	No Portador 1	P	OR (95 %CI)*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
rs2294020 1=G; 2=A	294 (93%)	396 (95%)	22 (7%)	23 (5%)	0,40	0,78 (0,41-1,48)
rs228083 1=T; 2=C	228 (72%)	328 (78%)	88 (28%)	91 (22%)	<b>0,05</b>	<b>0,72 (0,51-1,02)</b>
rs4824747 1=G; 2=T	310 (98%)	409 (98%)	5 (2%)	7 (2%)	0,91	1,06 (0,30-3,88)

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad. EM=Esclerosis Múltiple. Cont= Controles.

Tabla 37. Comparación de las frecuencias de portadores del alelo minoritario para cada uno de los tres SNPs analizados en *Foxp3* en mujeres de EM y en Controles mujeres.

SNPs <i>Foxp3</i> Mujeres	Portador 2	Portador 2	No Portador 2	No Portador 2	P	OR (95 %CI)*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
rs2294020 1=G; 2=A	131 (41%)	180 (43%)	185 (59%)	239 (57%)	0,68	0,94 (0,69-1,28)
rs228083 1=T; 2=C	227 (72%)	315 (75%)	89 (28%)	104 (25%)	0,30	0,84 (0,60-1,19)
rs4824747 1=G; 2=T	46 (15%)	96 (23%)	269 (85%)	320 (77%)	<b>0,004</b>	<b>0,57 (0,38-0,58)</b>

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad. EM=Esclerosis Múltiple. Cont= Controles.

La comparación entre mujeres de EM y las mujeres controles para el microsatélite analizado de *Foxp3* mostró diferencias significativas genotípicas para el genotipo 15/17 frente



al resto (Tabla 38). La comparación, en el grupo de los hombres, de frecuencias alélicas para el microsatélite analizado, no mostró diferencias significativas entre afectados de EM y controles (datos no mostrados).

Tabla 38. Comparación de las frecuencias genotípicas para el microsatélite de *Foxp3* en mujeres con EM y en controles mujeres. Se excluyen los genotipos cuya frecuencia es  $\leq 1\%$ .

Microsatélite <i>Foxp3</i> Mujeres		EM (N=287)		Controles (N=414)		p	OR (95 %CI)*
Frecuencias genotípicas		n	%	n	%		
	15/15	106	37	135	33	0,23	1,21 (0,87-1,68)
	15/16	102	35	159	38	0,44	0,88 (0,64-1,22)
	15/17	14	5	41	10	<b>0,01</b>	<b>0,47 (0,24-0,90)</b>
	16/16	51	18	62	15	0,32	1,23 (0,80-1,88)
	16/17	14	5	17	4	0,62	1,20 (0,55-2,60)

**p global = 0,09.  $\chi^2=7,80$**

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

EM=Esclerosis Múltiple.

La región donde se ubica *Foxp3*, dentro del cromosoma X, ha sido asociada a diversas patologías autoinmunes<sup>404 405</sup> y se encuentra cerca de regiones asociadas a AR<sup>406 407</sup>.

*Foxp3* se ha relacionado con la EM a nivel funcional<sup>86 306</sup>; sin embargo, esta relación no ha sido observada a nivel genético en ninguno de los estudios de barrido genómico. Este hecho puede deberse a que algunos de estos estudios no incluyen el cromosoma X en el análisis, a que los SNPs elegidos no cubren suficientemente la variabilidad de la región, o a que no tienen el suficiente DL con la(s) variantes causales de la asociación a EM de *Foxp3* para que el efecto sea detectado. En cualquier caso, no podemos olvidar que estos estudios de barrido genómico solo han podido explicar, hasta la fecha, el 20% del riesgo genético para el desarrollo de EM<sup>325</sup>.

Se han realizado varios estudios buscando la relación, a nivel genético, entre *Foxp3* y otras enfermedades, los resultados han sido contradictorios<sup>397 401</sup>. Se ha planteado que esta disparidad de resultados, se deba a las diferencias entre poblaciones, como ocurre en el caso de *PADI4* en la AR<sup>408-410</sup>, estudiado también en población española<sup>411</sup>, y/ o que los SNPs analizados no pertenezcan exactamente al locus de susceptibilidad<sup>399 401</sup>. En el estudio realizado por Owen *et al* 2006<sup>399</sup>, a pesar de no encontrar relación con la enfermedad de Graves ni la de Addison, no descartan definitivamente la asociación entre *Foxp3* y estas enfermedades, ya que uno de los haplotipos de la región estudiada por ellos (que incluye

*Foxp3* y regiones colindantes) presenta una significación de  $p=0,01$ , que debido a la aplicación de corrección podría estar siendo injustamente desestimada<sup>399</sup>. Entre los SNPs que se han elegido para el análisis de *Foxp3* en esta tesis está el SNP rs228083, cuya asociación a EM, al igual que sucedía en la enfermedad de Graves y en la de Addison, no soporta corrección estadística ( $p=0,05$ ).

Sólo un tercio de los loci asociados a EM, están asociados a otra enfermedad autoinmune. Sin embargo, no podemos desestimar que *Foxp3* se asocia a la susceptibilidad de otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis<sup>397</sup> o el LES<sup>398</sup>.

Está claro que *Foxp3* es un gran candidato para ser estudiado en el contexto de las enfermedades autoinmunes. Hemos visto que su implicación en la EM no es sólo funcional, sino que ejerce un efecto de protección frente al desarrollo de EM. Efecto observado para el alelo minoritario del SNP rs4824747 [ $p=0,008$ , OR=0,62 (0,43-0,90)], el alelo frecuente del SNP rs228083 [ $p=0,05$ , OR=0,95 (0,77-1,17)] y para el microsatélite analizado, donde ser portador del genotipo 15/17 protege frente al desarrollo de EM [ $p=0,01$  OR=0,47 (0,24-0,90)]. Este efecto sólo se observa en mujeres. Lo que puede deberse a varios factores como las interacciones epigenéticas que pudieran condicionar un fenotipo diferente en mujeres y hombres. No podemos olvidar, que en la EM existe una diferencia en la incidencia entre hombres y mujeres, y que este hecho probablemente tenga una base genética. Es posible que parte de los factores de riesgo genético para el desarrollo de EM difieran entre ambos sexos. De hecho, se ha demostrado que la expresión de algunos genes a nivel cerebral es dimórfica y que los mecanismos epigenéticos pueden ser, en parte, responsables de las diferencias en cuanto a susceptibilidad en enfermedades neurológicas<sup>412</sup>.

En cualquier caso, sería interesante replicar estos resultados en otras poblaciones y en cohortes de mayor tamaño, así como el mejor entendimiento de las rutas y mecanismos moleculares de *Foxp3* para determinar cuál es su verdadera implicación una enfermedad tan compleja como la EM.

## 7.2. Estratificación.

### 7.2.1. HLA-DRB1\*15:01

La comparación en mujeres entre los grupos HLA- 15:01+ frente a 15:01- no mostró diferencias significativas (datos no mostrados).

En el grupo de los hombres, el SNP rs2294020 mostró diferencias significativas que aumenta al comparar frente a controles hombres (Tabla 39). El resto de los SNPs no mostró diferencias significativas (datos no mostrados).

El microsatélite estudiado no mostró diferencias a ningún nivel para ambos géneros.

Tabla 39. Comparación de las frecuencias alélicas para el SNP rs2294020 del gen *Foxp3* en hombres con EM estratificados por *HLA-DRB1\*15:01* y en controles.

Foxp3 rs2294020 G/A 15:01 Hombres										
		15:01+ (N=57)		15:01- (N=113)		Controles (N=364)		15:01+ vs. 15:01-	15:01+ vs. Controles	
		n	%	n	%	n	%	p	P	OR (95 %CI)
Alélicas	A	20	35	23	20	73	20	0,03	0,01	2,15 (1,16-4,09)
	G	37	65	90	80	291	80			

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
15:01+: portadores de *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01-: no portadores de *HLA-DRB1\*15:01*.

En varones portadores de *HLA-DRB1\*15:01*, el hecho de portar el alelo de menor frecuencia del SNP rs2294020 aumenta el riesgo de padecer EM. Al igual que hemos expuesto previamente para el *CD46*, no es la primera vez que un SNP que no ha mostrado asociación a la EM globalmente, sí la ha mostrado al ser estudiado en un grupo de pacientes seleccionado por el alelo *HLA-DRB1\*15:01*<sup>120 308 309</sup>. Esto puede ser explicado por la influencia de factores ambientales y/o epigenéticos en la penetrancia de una variante genética. Como se expuso previamente, la expresión de algunos genes a nivel cerebral es dimórfica y los mecanismos epigenéticos podrían ser responsables de las diferencias en cuanto a susceptibilidad en enfermedades neurológicas<sup>412</sup>. Es posible que los mecanismos de epístasis entre genes también tuvieran algo que decir en la diferencia de susceptibilidad de la EM entre hombres y mujeres.

Por otro lado, sabemos que los niveles de Treg *Foxp3*+ y de vitamina D son mayores en mujeres con EM que en hombres<sup>413</sup> y se ha observado que la vitamina D regula la función de Treg *Foxp3*+<sup>414</sup>. De esta forma, y teniendo en cuenta que el *HLA-DRB1\*15:01* presenta una

región de respuesta exclusiva a vitamina D<sup>148</sup>, es posible que en varones, esta acción conjunta entre genes, pueda explicar, al menos en parte, la variabilidad entre géneros observada para la asociación de *Foxp3* a la EM.

### 7.2.2. Resto de estratificaciones

El *Foxp3* ha mostrado asociación con la forma clínica de DM1 a nivel genético<sup>403</sup> y sabemos que en los pacientes RR la función de Treg FoxP3+ está alterada. Es factible pensar que este gen tenga algo que decir en la forma de presentación de la EM.

La comparación a nivel de mujeres y hombres entre los grupos PP y No PP, no mostró diferencias significativas para ninguno de los SNPs, ni para el microsatélite estudiado (datos no mostrados).

Si bien es cierto que *Foxp3* está alterado en pacientes con EM, estos estudios siempre se han realizado frente a controles y no comparando una forma clínica con otra, por lo que se desconoce si esta alteración condiciona o no el fenotipo de la EM. En nuestro caso, el hecho de no encontrar efecto puede deberse a una baja potencia estadística derivada de la estratificación.

No se realizó la estratificación por HHV6, Progresión ni Edad de Debut ni a nivel de marcadores individuales ni a nivel de haplotipos debido a que el pequeño tamaño muestral, derivado del estudio por separado de hombres y mujeres, impedía un correcto análisis estadístico.

### 7.3. Cálculo del DL y estimación de Haplotipos

Los 3 SNPs (orden correspondiente al que ocupan en el gen) en mujeres (Fig. 32), observamos presentan un fuerte DL ( $D'$  muy cercano a  $D':1$ ). Cuando el DL entre parejas de SNPs es  $D':1$ , los haplotipos que forman entre ellos pueden ser siempre deducidos en un individuo. Esto permite realizar el recuento directo de los haplotipos, que confirmaron la precisión del cálculo de Expectación-Maximización. El cálculo de Expectación-Maximización se realizó sólo en mujeres, ya que no era aplicable en hombres al ser monoalélicos (donde los

haplotipos no necesitan ser deducidos). Para el cálculo de DL del microsatélite se empleó el programa 2dL (Fig. 33)

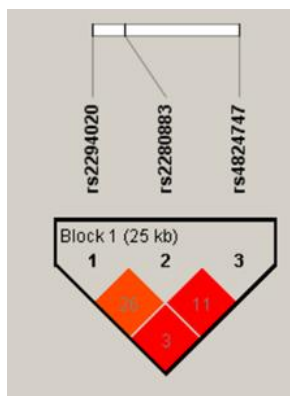


Fig. 32.

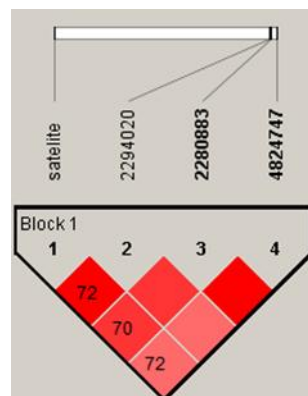


Fig. 33

**Fig. 32.** Cálculo de DL entre los 3 SNPs analizados de *Foxp3* en mujeres control.

Números:  $r^2$ . Colores: rojo es  $D':1$  (Cuanto menor es  $D'$  más se aleja del color rojo).

**Fig. 33.** Cálculo del DL de los 3 SNPs de *Foxp3* con el microsatélite de *Foxp3* en mujeres control.

Números =  $D':1$  (Color no valorable).

La comparación de las frecuencias entre los enfermos de EM y los controles de los haplotipos hallados reveló diferencias significativas en hombres y tendencia a la significación en mujeres (Tablas 40 y 41).

Tabla 40. Comparación de Haplotipos de *Foxp3* más frecuentes observados en mujeres de nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM y de controles. Orden 5'-3'.

Haplotipos <i>Foxp3</i> Mujeres	EM (N=293)		Controles (N=414)		p	OR (95 %CI)*
	n	%	n	%		
15GTG	123	42	170	41	0,80	1,04 (0,76-1,42)
15GCG	12	4	8	2	<b>0,08</b>	<b>2,17 (0,81-5,88)</b>
15GCT	22	7,5	46	11	0,10	0,65 (0,37-1,14)
16ACG	53	18	75	18	0,99	1,0 (0,66-1,50)
16GTG	9	3	12	3	0,89	1,06 (0,41-2,74)
16GCG	47	16	58	14	0,45	1,17 (0,76-1,82)
17ACG	7	2,5	17	4	0,21	0,57 (0,21-1,48)**
17GTG	7	2,5	12	3	0,67	0,82 (0,29-2,27)
Otros**	13	4,5	16	4	0,70	1,15 (0,51-2,58)

p global = 0,47,  $\chi^2=7,58$  (no incluye los haplotipos con frecuencia <2%).

\*\*Otros: haplotipos encontrados en enfermos y controles cuya frecuencia estimada es menos del  $\leq 2$

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\* Test exacto de Fisher, p a 2 colas.

Tabla 41. Comparación de Haplotipos de *Foxp3* más frecuentes observados en hombres de nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos de EM y de controles. Orden 5'-3'.

Haplotipos <i>Foxp3</i> Hombres	EM (N=164)		Controles (N=357)		p	OR (95 %CI)*
	n	%	n	%		
15GTG	70	43	152	43	0,98	1,00 (0,68-1,48)
15GCG	8	5	13	4	0,50	1,36 (0,50-3,59)
15GCT	20	12	41	11	0,81	1,07 (0,58-1,96)
16ACG	38	23	58	16	<b>0,05</b>	<b>1,55 (0,96-2,52)</b>
16GTG	2	1	14	4	0,09	***
16GCG	18	11	53	15	0,23	0,71 (0,38-1,29)
OTROS**	8	5	26	7	<b>0,29</b>	<b>0,65 (0,26-1,55)</b>

p global = 0.17,  $\chi^2=11.46$ .

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\*Otros: haplotipos encontrados en enfermos y controles cuya frecuencia estimada es menos del  $\leq 2\%$ .

\*\*\*Test exacto de Fisher, p a 2 colas. EM: Esclerosis Múltiple.

La significación encontrada no soporta corrección estadística. Esto podría atribuirse al tamaño muestral. Sin embargo, la potencia estadística de este estudio permite detectar efectos con OR=1,45 para el alelo minoritario, con una probabilidad del 85% y una confianza del 95%. Además, no podemos pasar por alto, la asociación encontrada a nivel de SNP en mujeres. Es posible que este marcador de *Foxp3* esté resaltando la asociación de éste u otro gen (en alto DL con el marcador analizado) de la región Xp11 (donde se ubica *Foxp3*) con la EM, de forma que al dividir en haplotipos este efecto se pierda. Así, se hace necesario un análisis más amplio de la región Xp11, que ha sido asociada a EM<sup>415</sup> y a la DM1<sup>416</sup>, para determinar cuál es el locus que realmente está implicado en la EM y determinar si *Foxp3* está o no asociado a esta enfermedad.

### 7.3.1. Estratificación de haplotipos

#### a) *HLA-DRB1\*15:01*

La estratificación de los haplotipos por *HLA-DRB1\*15:01* no mostró significación estadística para el grupo de las mujeres (datos no mostrados), pero en el grupo de los hombres el haplotipo 16ACG mostraba tendencia a la significación estadística por lo que se realizó la comparación del grupo de hombres portadores de *HLA-DRB1\*15:01* frente a controles (Tabla 42).

Tabla 42. Haplotipos de *Foxp3* más frecuentes observados en nuestra población en hombres, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de afectos de EM estratificados por *HLA-DRB1\*15:01* y en controles. Orden de los SNPs y el microsatélite 5'→3'.

Haplotipos <i>Foxp3</i> 15:01 Hombres	15:01+ (N=55)		15:01- (N=108)		Controles (N=357)		15:01+ vs. 1501-	15:01+ vs. Controles	
	n	%	n	%	n	%	p	P	OR (95 %CI)*
15GTG	23	42	47	43	152	43	0,83	0,91	0,97 (0,52-1,79)
15GCG	3	5,3	5	5	13	4	0,54	0,36	***
15GCT	3	5,3	16	15	41	11	<b>0,07</b>	0,17	0,44 (0,11-1,57)
16ACG	17	31	21	19	58	16	<b>0,10</b>	<b>0,008</b>	<b>2,31 (1,16-4,55)</b>
16GCG	6	11	12	11	53	15	0,96	0,43	0,70 (0,26-1,82)
17ACG	3	5,3	1	1	9	3	0,11	0,20	***
Otros**	0	0	6	6	33	8	<b>0,09</b>	<b>0,01</b>	***

p global (15:01+ vs. 15:01-)= 0,13  $\chi^2 = 10,97$ . p global (15:01+ vs. Controles)= 0,04  $\chi^2 = 14,36$ .

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\*Otros: haplotipos encontrados en enfermos y controles cuya frecuencia estimada es menos del  $\leq 2\%$ .

\*\*\*Test exacto de Fisher, p a 2 colas (intervalos de confianza no válidos). 15:01+: portadores de *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01-: no portadores de *HLA-DRB1\*15:01*.

Teniendo en cuenta estos datos y los observados a nivel genotípico parece que existe interacción entre el *Foxp3* y el *HLA-DRB1\*15:01* para el desarrollo de EM en los hombres. De hecho, en la comparación de haplotipos entre el total de enfermos varones frente hombres control el haplotipo 16ACG mostraba aumento en la susceptibilidad a EM con OR=1,55 (p=0,05).

Si tenemos en cuenta los resultados hallados a nivel de SNP individual y la relación funcional que existe entre *HLADRB1\*15:01* y *Foxp3* con la vitamina D<sup>148 413 414</sup>, es probable que exista una interacción entre ambos genes para el desarrollo de EM en varones. Además, la menor incidencia de EM en varones se puede deber a múltiples factores y entre ellos no podemos descartar que la susceptibilidad genética a EM difiera entre hombres y mujeres.

Parece claro que *Foxp3* está asociado a EM, pero esta asociación parece diferente entre hombres y mujeres. Esto plantea nuevos interrogantes, tanto a nivel de la implicación de este gen en la EM, como su relevancia en la diferencia de susceptibilidad a EM que existe entre hombres y mujeres. Queda claro, por tanto, que *Foxp3* (y la región Xp11) merecen un estudio en profundidad, para desentrañar el papel que realmente está desempeñando en la EM.

## 8. GPC5

Los glipicanos han mostrado una capacidad coadyuvante en la señalización de citoquinas<sup>417</sup>. Ampliamente estudiada ha sido su capacidad de unión a miembros de la superfamilia TGF $\beta$ <sup>418</sup>, de ahí la idea de que el GPC5 pudiese intervenir en la unión de IFN $\beta$  a su receptor, y por tanto, polimorfismos de este gen pudieran influenciar la respuesta a este tratamiento. La asociación entre *GPC5* y el tratamiento de EM con IFN $\beta$  ha sido descrita en un estudio de barrido genómico de farmacogenética de la EM<sup>210</sup> y nos propusimos replicarla en una cohorte independiente<sup>419</sup>.

Dentro de las funciones del GPC5 cabe destacar su papel en la neurogénesis cerebral, en la formación de sinapsis y en la regeneración y orientación axonal<sup>420 421</sup>. Además, se ha observado la presencia de densas redes de glipicanos en la matriz extracelular de las lesiones de EM<sup>422</sup>. Esto lleva a pensar que *GPC5* no sólo tenga un papel en la respuesta terapéutica, sino también en la propia etiopatogenia de la EM. Dicha asociación entre varios SNPs del *GPC5* y la susceptibilidad a EM ha sido descrita en un estudio de barrido genómico<sup>291</sup> y recientemente replicada, para el SNP rs9523787, en una cohorte diferente<sup>423</sup>.

Replicar estos hallazgos es de gran importancia para lograr los objetivos de una terapia personalizada y para elucidar los complejos mecanismos de esta enfermedad. Se analizaron 3 SNPs, para el estudio de *GPC5*. Sin embargo, debido a que estos 3 SNPs no cubren un porcentaje relevante de la variabilidad del gen y el SNP rs10492503 pertenece a un bloque de DL distinto al de los otros 2 SNPs, no se realizó un estudio de haplotipos, dado que dicho análisis podría dar resultados equívocos y en cualquier caso no valorables.

### 8.1. Genotipado.

La comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles no mostró diferencias significativas en 2 de los SNPs. Sin embargo, el SNP rs9523554 mostró tendencia estadística a la significación en las frecuencias genotípicas y significación en las frecuencias alélicas y para portadores del alelo de mayor frecuencia (Tablas 43 - 45).



Los datos de los carriers de los alelos de menor frecuencia, para los 3 SNPs analizados no se muestran por no ser significativos.

Tabla 43. Comparación de las frecuencias genotípicas para cada uno de los tres SNPs analizados en *GPC5* en enfermos de EM y en controles.

SNPs <i>GPC5</i>	11		12		22		p	Chi cuadrado
	EM	Cont	EM	Cont	EM	Cont		
<b>rs10492503</b>	285	182	186	125	40	34	0,52	1,30
<b>1=A; 2=T</b>	(56%)	(53%)	(36%)	(37%)	(8%)	(10%)		
<b>rs1411751</b>	410	252	130	91	13	14	0,28	2,53
<b>1=C; 2=T</b>	(74%)	(71%)	(24%)	(25%)	(2%)	(4%)		
<b>rs9523554</b>	160	114	233	164	139	66	<b>0,06</b>	<b>5,62</b>
<b>1=C; 2=T</b>	(30%)	(33%)	(44%)	(48%)	(26%)	(19%)		

EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 44. Comparación de las frecuencias alélicas para cada uno de los nueve polimorfismos analizados en *GPC5* en enfermos de EM y en controles.

SNPs <i>GPC5</i>	1	1	2	2	p	Odds Ratio*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
<b>rs10492503</b>	756	489	266	193	0,30	1,12 (0,90-1,40)
<b>1=A; 2=T</b>	(74%)	(72%)	(26%)	(28%)		
<b>rs1411751</b>	950	595	156	119	0,13	1,22 (0,93-1,59)
<b>1=C; 2=T</b>	(86%)	(83%)	(14%)	(17%)		
<b>rs9523554</b>	553	392	511	296	<b>0,04</b>	<b>0,82 (0,67-1,00)</b>
<b>1=C; 2=T</b>	(52%)	(57%)	(48%)	(43%)		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2X2 con 2 grados de libertad.

EM: Esclerosis Múltiple. Cont: Controles.

Tabla 45. Comparación de las frecuencias de portadores del alelo frecuente para cada uno de los tres polimorfismos analizados en *GPC5* en enfermos de EM y en controles.

SNPs <i>GPC5</i>	Portador 1	Potador 1	No Portador 1	No Portador 1	p	Odds Ratio*
	EM	Cont.	EM	Cont.		
<b>rs10492503</b>	471	307	40	34	0,27	1,30 (0,79-2,16)
<b>1=A; 2=T</b>	(92%)	(90%)	(8%)	(10%)		
<b>rs1411751</b>	530	343	13	14	0,18	1,66 (0,73-3,81)
<b>1=C; 2=T</b>	(98%)	(96%)	(2%)	(4%)		
<b>rs9523554</b>	393	278	139	66	<b>0,01</b>	<b>0,67 (0,48-0,95)</b>
<b>1=C; 2=T</b>	(74%)	(81%)	(26%)	(19%)		

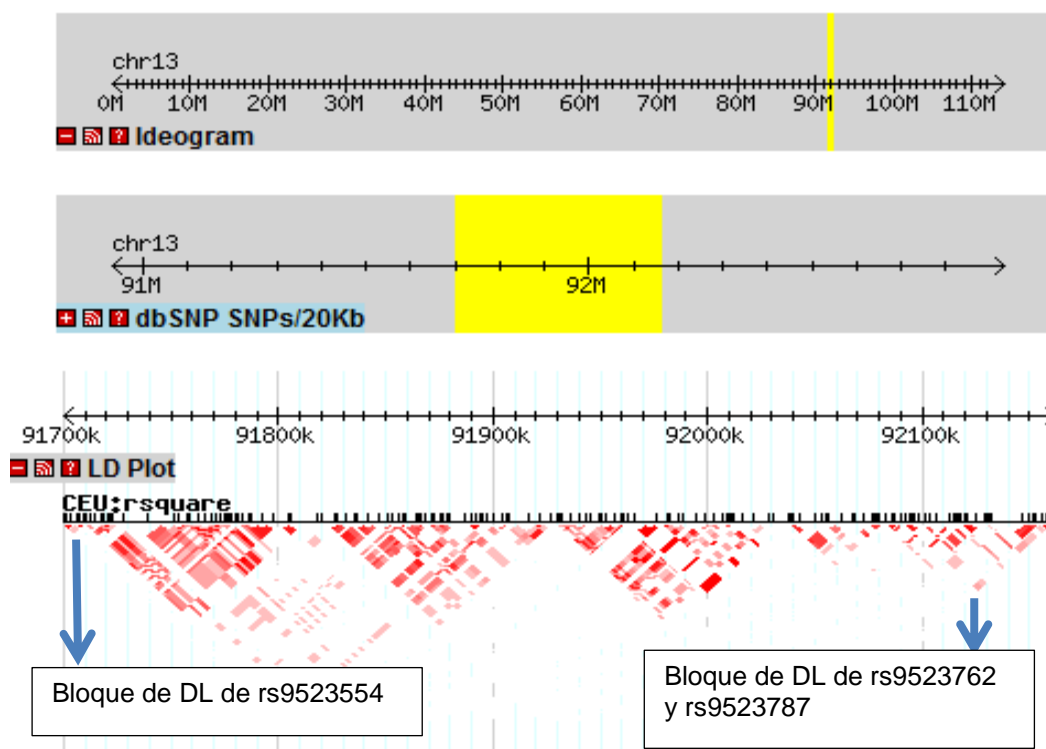
\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2X2 con 2 grados de libertad.

La asociación de *GPC5* a la EM ha sido replicada muy recientemente en población española<sup>424</sup>. En el estudio de barrido genómico y en el estudio español se encontraba asociación para el rs9523762 (posición 92129877 en el cromosoma 13). Sin embargo, en el estudio de Lorentzen, *et al* 2010<sup>423</sup>, se encontraba asociación con otro SNP de *GPC5*, el rs9523787 (posición 9216175 en el cromosoma 13), que está situado a 32Kb del anteriormente asociado y en el mismo bloque de DL.

Estos 3 estudios<sup>291 423 424</sup> encuentran que el alelo de menor frecuencia, para los polimorfismos estudiados, confieren riesgo para el desarrollo de EM, hecho que podría ser

expresado como un efecto protector del alelo común del rs9523554 frente a EM, que es el efecto de mayor significación ( $p=0,01$ ,  $OR=0,82$ ) observado para el SNP analizado en esta tesis. Este hecho, puede ser debido a varios factores. Uno de ellos podría ser que el SNP aquí estudiado (rs9523554 posición 91700016 en el cromosoma 13) se encuentra en un bloque de DL distinto al bloque en que se encuentran los otros dos SNPs (Fig. 34). Por tanto, podría estar en menor DL con el locus verdaderamente asociado. Otro factor, podría ser que la asociación aquí encontrada presenta una menor potencia estadística, probablemente debida al menor tamaño muestral, que en los otros estudios mencionados. Por último, otra de las causas que pueden provocar variabilidad en los análisis de asociación es una diferente distribución alélica de las poblaciones.

### Mostrando 462 kbp de chr13, posiciones 91,700,000 a 92,162,000



**Fig. 34.** Posición genómica de los rs9523554, rs9523762 y rs9523787 del gen *GPC5*. Datos tomados de HapMap.

Parece claro que el *GPC5* se asocia con la susceptibilidad a EM y se hace imprescindible un estudio exhaustivo de la región para determinar el alcance de la variabilidad genética de *GPC5* en la EM. Así como estudios funcionales que esclarezcan las lagunas, que aún quedan por dilucidar, de las funciones de esta proteína y que ayuden al entendimiento de su función en la EM.

## 8.2. Estratificación.

### 8.2.1. HLA-DRB1\*15:01

La comparación entre 15:01+ y 15:01- no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario para 2 SNPs (datos no mostrados). Sin embargo, en la comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente, del SNP rs9523554 encontramos significación. Por tanto, se realizó la comparación del grupo de los 15:01+ frente a los controles, observándose mayor significación estadística (Tablas 46).

Tabla 46. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo frecuente para el SNP rs9523554 del gen *GPC5* en enfermos de EM estratificados por *HLA-DRB1\*15:01* y en controles.

<b>GPC5 rs9523554 C/T</b>		<b>15:01+ (N=182)</b>		<b>15:01- (N=321)</b>		<b>Controles (N=344)</b>		<b>15:01+ vs. 15:01-</b>		<b>15:01+ vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR (95%CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>TT</b>	60	33	98	30	66	19				
	<b>CT</b>	70	38	153	48	164	48	<b>0,01</b>	$\chi^2= 7,96$	<b>0,001</b>	$\chi^2= 12,49$
	<b>CC</b>	52	29	70	22	114	33				
<b>Alélicas</b>	<b>T</b>	190	52	293	30	296	43	<b>0,04</b>		<b>0,004</b>	<b>1,45 (1,11-1,55)</b>
	<b>C</b>	174	48	349	48	392	57				
	<b>CC+CT</b>	60	33	70	9	66	19	<b>0,006</b>		<b>0,0004</b>	<b>2,07 (1,35-3,18)</b>
	<b>TT</b>	122	67	251	91	278	81				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
15:01+: portadores de *HLA-DRB1\*15:01*. 15:01-: no portadores de *HLA-DRB1\*15:01*.

De estos datos se deduce que puede existir interacción entre los genes que codifican la molécula presentadora de clase II y el *GPC5* para el desarrollo de EM. Esta interacción aparece en el mismo sentido que la observada en el genotipado general, de forma que los portadores de *HLA-DRB1\*15:01* que además portan el alelo de susceptibilidad de *GPC5*, tienen mayor riesgo de desarrollar EM [p=0,004 OR=1,45 (1,11-1,88)].

Este es el primer estudio en el que se muestra la epistasis entre estas 2 regiones. En el estudio de barrido genómico<sup>291</sup> corrigen el efecto observado para *GPC5* por la condición de portador de *HLADR\*15:01*; por lo que es de suponer que observan un efecto combinado entre ambos; sin embargo, no hacen referencia a la interacción entre uno y otro.

Otros estudios han referenciado la epistasis entre genes para el desarrollo de enfermedades tan complejas como la EM<sup>332</sup>. El efecto sobre la susceptibilidad a EM de algunos

de los genes que ya habían mostrado asociación independiente a la EM<sup>70 347</sup>, se ha visto incrementado al combinarlos con el estatus de portador de *HLADR\*15:01*. En esta tesis este hecho se ha observado también para *CD46* y *Foxp3*. Este efecto puede ser explicado porque la penetrancia de una variante genética se vea influenciada no solo por factores ambientales y epigenéticos, sino por la variabilidad en otros factores genéticos que pudieran interactuar sobre ella.

La EM se considera una enfermedad multifactorial en la que sobre una base genética, compuesta por efecto de múltiples genes de susceptibilidad, se desarrollará la enfermedad al darse un contexto ambiental propicio. Por tanto, parece claro que *GPC5* es un factor de susceptibilidad a EM, y es probable que esta susceptibilidad se vea incrementada en el caso de ser portador de *HLA-DRB1\*15:01*.

### 8.2.2. Edad de Debut

La comparación entre pacientes menores de 18 años y pacientes a partir de 18 y menores de 50 años mostró diferencias significativas alélicas y entre portadores del alelo minoritario (y con tendencia a la significación a nivel de frecuencias genotípicas) para 1 de los SNPs, rs10492503 (Tabla 47). Los otros SNPs no presentaron diferencias a ningún nivel (datos no mostrados).

Tabla 47. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y portadores del alelo minoritario para el SNP rs10492503 del gen *GPC5* en enfermos de EM estratificados por edad de Debut.

<b>GPC5</b> <b>rs10492503 A/T</b>		<b>&lt;18</b> <b>(N=17)</b>		<b>≥18≤50</b> <b>(N=343)</b>		<b>Controles</b> <b>(N=341)</b>		<b>&lt;18 vs.</b> <b>≥18≤50</b>		<b>&lt;18 vs. Controles</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>p</b>		<b>p</b>	<b>OR (95%CI)*</b>
<b>Genotípicas</b>	<b>TT</b>	1	0	22	7	34	10				
	<b>AT</b>	3	19	139	40	125	36	<b>0,07</b>	$\chi^2=5,10$	<b>0,17</b>	$\chi^2=3,50$
	<b>AA</b>	13	81	182	53	182	54				
<b>Alélicas</b>	<b>T</b>	3	10	183	27	193	28	<b>0,04</b>		<b>0,03</b>	<b>**</b>
	<b>A</b>	26	90	503	73	489	72				
	<b>TT+AT</b>	3	19	161	47	159	46	<b>0,02</b>		<b>0,02</b>	<b>**</b>
	<b>AA</b>	13	81	182	53	182	54				

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.

\*\*Test exacto de Fisher, p a 2 colas. <18: pacientes con edad inferior a 18 años. ≥18≤50: pacientes con edad superior o igual a 18 años e inferior o igual a 50.

Al igual que para *CD46*, no es posible la comparación del grupo de debut temprano frente a controles ajustados por edad, ya que no disponemos de controles menores de edad. Sin embargo, la comparación de este grupo frente a controles (adultos), mostró diferencias significativas (Tabla 47). La comparación de enfermos con edad de debut clásica frente a controles, no mostró diferencias significativas (datos no mostrados).

Algunas enfermedades autoinmunes presentan genes de susceptibilidad específicos de ciertos grupos de edad<sup>310</sup>, y en algunos casos éstos condicionan la forma de la enfermedad<sup>311</sup><sup>312</sup>. Los pacientes con forma temprana de la enfermedad podrían tener características genéticas únicas<sup>313</sup>.

Este SNP no ha mostrado asociación a la enfermedad. Sin embargo, sí ha mostrado asociación al fenotipo de la EM, al haberse descrito en un estudio de barrido genómico<sup>210</sup> y también replicado<sup>419</sup> en la respuesta a tratamiento con IFN $\beta$  de los pacientes con EM.

Si bien, el efecto protector frente a un debut temprano de la enfermedad (o susceptibilidad a una forma típica de EM) apenas soporta la corrección estadística ( $p$ -corregida=0,06), sí nos plantea que *GPC5* pudiera tener algo más que decir en su implicación en la EM. No podemos olvidar que este SNP se encuentra a 1,8Mb del *GPC5* y que pudiera estar marcando una región diferente de asociación a EM. Dentro del *GPC5* existen distintos bloques de DL (Fig. 34), que pueden condicionar, al menos en parte, las observaciones acerca de la susceptibilidad EM en función del SNP analizado. Por otro lado, el SNP rs10492503 no está dentro de los bloques de DL previamente analizados. Aunque se haya publicado que *GPC5* no se asocia a alguna de las características fenotípicas de EM<sup>291</sup>, nuestros resultados sugieren que la implicación de *GPC5* en la EM es mayor a la descrita hasta el momento, y que la región genómica en la que se ubica merece un estudio más amplio para conocer hasta dónde llega su importancia en esta enfermedad.

En cualquier caso sería conveniente realizar este estudio caso-control ajustado por edad, para confirmar la validez de los resultados obtenidos.

### 8.2.2. Resto de estratificaciones

La comparación entre los grupos de cada una de las clasificaciones no mostró diferencias genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario significativas para ninguno de los SNPs analizados.

Sólo se ha publicado un estudio en el que se analizase la implicación de *GPC5* con algunos aspectos fenotípicos de la EM<sup>291</sup> y no encontraba asociación a ninguna de las características analizadas.

## 9. *PODXL*

La *PODXL* está implicada en el desarrollo cerebral (fasciculación axonal, neuritogénesis y sinaptogénesis)<sup>425</sup> y su expresión es mayor en microvasculatura cerebral que en otros tejidos<sup>426</sup>. Además, se ha asociado a alteraciones del SNC, su ausencia en cerebro de ratones provoca una importante afectación del sistema vascular cerebral<sup>425 427</sup> y está sobrepresada en las células endoteliales en torno a glioblastomas<sup>428</sup>.

No están claras ni la función *PODXL* ni la causa de su expresión preferencial en la BHE. Su presencia selectiva y su acción facilitando la migración transendotelial de células hematopoyéticas (por adhesión y regulando la forma de las mismas), hacen pensar que tenga un papel en la homeostasis de la BHE. La infiltración del SI a través de la BHE es un hecho temprano en la EM y para que se produzca es necesaria la diapédesis de células del SI a través de la BHE<sup>429</sup>. Además, la BHE actúa diferenciando y seleccionando los Th17<sup>430</sup>.

Así, se hace interesante valorar si el gen codificador de *PODXL* tiene algo que decir en el desarrollo de la EM. Para ello, de entre varios SNPs de esta región (datos públicos pertenecientes al GWAS Nature, 2007<sup>326</sup>), se seleccionó el que mayor tendencia a la asociación presentaba para otras patologías de estirpe autoinmune presenta.

### 9.1. Genotipado del SNP.

La comparación de las frecuencias genotípicas alélicas y entre portadores del alelo minoritario no mostró diferencias significativas para el SNP (rs1477226) analizado (Tabla 48).

Tabla 48. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el polimorfismo rs1477226 de *PODXL* en enfermos de EM y en Controles.

<i>PODXL</i> rs1477226 T/C		EM (N=478)		Controles (N=770)		p	OR (95 %CI)*
Genotípicas	CC	13	3	16	2		
	TC	114	24	197	26	0,62	$\chi^2=0,93$
	TT	351	73	557	72		
Alélicas	C	140	15	229	15	0,87	0,98 (0,78-1,24)
	T	816	85	1311	85		
	CC+CT	127	27	213	28	0,67	0,95(0,73-1,23)
	TT	351	73	557	72		

\*Odds Ratio con una IC-95% por tratarse de una tabla de contingencia 2x2 con 2 grados de libertad.  
EM: Esclerosis Múltiple.

## **9.2. Estratificación del SNP.**

La comparación entre los grupos para cada una de las subclasificaciones no mostró diferencias significativas genotípicas, alélicas ni entre portadores del alelo minoritario para el SNP analizado (datos no mostrados).

Está claro que la *PODXL* juega un papel importante no solo para el mantenimiento de la homeostasis de la BHE, sino también en el mantenimiento de estructuras cerebrales<sup>425</sup>. Sin embargo, este papel ejercido a través de moléculas que aún no han sido descritas no parece presentar una correlación genética en el contexto de la EM.

El papel de la *PODXL* en el desarrollo cerebral ha sido observado en ratones, pero no ha sido descrito en humanos, y en cualquier caso este papel aún no está claro ya que los ratones defectivos para *podxl* presentan alteraciones en las estructuras cerebrales, pero no alteraciones de tipo neurológico<sup>427</sup>. Esto sugiere que su función no es tan relevante y podría explicar que no haya presentado asociación con una enfermedad neurodegenerativa como la EM. Por otro lado, aunque los estudios de barrido genómico sólo explican el 20%<sup>325</sup> de la susceptibilidad a EM, el hecho de que no se haya asociado *PODXL* a EM en ninguno de ellos, ni en los metanálisis ulteriores, junto con los resultados aquí mostrados, y a que tampoco se ha descrito asociación entre este gen y otras enfermedades autoinmunes, parece indicar que *PODXL* no está asociada a la EM.



La importancia de este tipo de estudios (tagging y mapeo fino de SNPs) en busca de genes asociados a la EM y a los distintos aspectos de la misma, radica en que es tan importante el determinar tanto la asociación como la ausencia de la misma. Este es un primer paso en el desarrollo de futuras investigaciones y una base en la que apoyarse a la hora de continuar con estudios funcionales sobre la etiopatogenia de la EM. Estos resultados permiten seleccionar con mayor criterio los genes para dichos estudios con el fin de desentrañar las complejas preguntas que esta enfermedad plantea. Se acepta que en la EM actúan en conjunto factores ambientales y genéticos, tanto en su inducción como en su desarrollo. Determinar factores implicados en la predisposición o en la evolución de la EM permite un mejor entendimiento tanto de la etiología como de la patogenia de esta enfermedad. Pero quizá esta relevancia no se limite a la EM, ya que cada vez está más clara la acción pleiotrópica de los factores implicados en las enfermedades autoinmunes y los avances acaecidos en el estudio de cada una de ellas puede tener repercusión en otras.

Los estudios de asociación de genes a través de SNPs están condicionados por el tamaño muestral, la rigurosidad del diagnóstico y el correcto estudio genético de las muestras<sup>431</sup>. Por tanto, no hay que olvidar que este tipo de estudios requieren tanto la replicación del efecto encontrado, como la constatación funcional de la asociación observada para poder incluirlos en el proceso etiopatogénico de la EM.

## B. Farmacogenética

Los estudios farmacogenéticos centran su campo de investigación en la búsqueda de variaciones en genes candidatos que puedan estar implicados en distintos aspectos farmacológicos, entre ellos el mecanismo de acción, con el objetivo no sólo de determinar la presencia de predisposición a efectos adversos, sino también a predecir la respuesta a un fármaco concreto.

Existe una gran variabilidad interindividual en la respuesta a fármacos. Las causas de esta variabilidad son variadas: genéticas, ambientales, debidas al proceso patológico<sup>432</sup>. Esta variabilidad está claramente presente en los pacientes de EM y la respuesta a IFN $\beta$ , al que solo responden un 55-88% de los pacientes<sup>205</sup>. Actualmente la única forma de determinar la respuesta es el seguimiento clínico, lo que implica un retraso en la aplicación de otro fármaco en aquellos pacientes que no responden a IFN $\beta$ . Ante esta capacidad limitada en la predicción de respuesta, en una enfermedad donde un tratamiento adecuado y precoz mejora la calidad de vida, es imprescindible buscar marcadores de respuesta que permitan instaurar un tratamiento adecuado.

Hasta la fecha, varios polimorfismos han sido asociados a la respuesta a IFN $\beta$  en la EM<sup>210 211</sup>. Sin embargo, a pesar de los intentos por crear algoritmos de predicción de respuesta empleando los resultados de asociación derivados de estudios farmacogenómicos<sup>433</sup>, aún no tienen aplicación en la práctica clínica por la falta de validación de resultados para algunos de los polimorfismos y/o porque el efecto es poco relevante como para considerarlo a la hora de tomar una decisión terapéutica.

Además, los fenotipos de respuesta son complejos y en ellos están implicados factores tanto ambientales como genéticos<sup>434</sup>. Para intentar reducir esta complejidad, una de las técnicas empleadas es seleccionar fenotipos farmacológicos “extremos”, excluyendo en los análisis a respondedores intermedios y resistencias intermedias a tratamiento.

Está claro que es necesario seguir explorando el campo de la variabilidad genética en la respuesta de pacientes con EM a IFN $\beta$ , con el fin de entender mejor el funcionamiento de este fármaco y acercarnos a la meta de una terapia individualizada.

Se analizó el papel de todos los genes estudiados en cuanto a respuesta a INF $\beta$  pues dado que no se conoce con exactitud cual es el mecanismo de acción de este fármaco en el tratamiento de la EM, se postula que actúa en alguna de las rutas alteradas en la enfermedad y que, por tanto, depende de alteraciones en los genes de susceptibilidad que favorecen su aparición. La respuesta se valoró para Brotes y EDDS según los parámetros expuestos en Material y Métodos. Para evitar la presencia de fenotipos intermedios, que dificultan la detección de asociación, en el grupo de respondedores se incluyó sólo a aquellos pacientes que cumplían los criterios de respuesta para ambos criterios, y en el grupo de no respondedores sólo aquellos que no cumplían ninguno de los dos criterios; el resto fueron considerados “respondedores intermedios” y no fueron incluidos en el estudio.

Sólo se muestran aquellos resultados significativos.

## I. *TLR4*

A pesar de no haber encontrado asociación con la respuesta a IFN $\beta$  de los SNPs de *TLR4* (datos no mostrados), se hace imprescindible el estudio haplotípico para determinar la existencia o no de asociación. Teniendo en cuenta los datos derivados del análisis de DL, se realizó el estudio solo en los 8 SNPs con alto DL, encontrándose la significación (Tabla 49).

Tabla 49. Haplotipos de *TLR4* más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos respondedores y no respondedores a IFN $\beta$ . Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos <i>TLR4</i>	Respondedores (N=78)		No Respondedores (N=134)		P
	n	%	n	%	
ACAATCTA	22	28	52	39	0,11
GCAACCCA	18	23	40	30	0,28
ACAGCCTA	8	11	12	9	0,75
ACGGCTTG	1	1	7	5	0,13
ATAACCTA	6	8	11	8	0,89
ACAGCTTG	4	5	7	5	0,62
ACAGCTTA	3	4	2	1,5	0,26
ACAACCTA	15	19	2	1,5	<10 <sup>-6</sup>
ACAACCCA	1	1	1	1	0,60

P global: 0,001.  $\chi^2=25,20$ .

Los pacientes RR que presentan el haplotipo ACAACCTA, tiene mayor probabilidad de responder a IFN $\beta$ .

No se ha encontrado, en los estudios de barrido genómico, asociación entre *TLR4* y respuesta a IFN $\beta$  en la EM. Sin embargo, estos estudios por el momento son pocos<sup>210-212</sup> y solo algunas de las asociaciones encontradas han sido replicadas de forma independiente<sup>419</sup>. Estos estudios presentan un estricto umbral de significación pudiendo dificultar la detección de señales de asociación real en un primer análisis. Estos hechos pueden explicar que no se haya encontrado asociación a *TLR4* en los estudios farmacogenómicos de EM.

Además, existen datos que apoyan el resultado obtenido. Así, el *TLR4* es el receptor de LPS por excelencia, y se ha visto que la señalización de la ruta IFN tipo I es necesaria para el aumento de la producción de IL-10 inducido por LPS<sup>435</sup>. Por otro lado, la ruta de señalización

principal de los TLRs es la proteína adaptadora MyD88, y esta proteína presenta un adaptador que induce IFN $\beta$  (TRIF)<sup>436 437</sup>.

Parece claro que el *TLR4* sí tiene algo que decir en cuanto a la respuesta a tratamiento con IFN $\beta$ . No hay que olvidar que aunque no haya mostrado asociación directa con la EM, sí parece implicado en su fenotipo. En cualquier caso es necesario un análisis más profundo de la relación funcional entre TLR4 e IFN $\beta$  y replicar estos resultados para su validación.

## II. CD46

No se encontró asociación para la respuesta a los SNPs de *CD46* (datos no mostrados). Sin embargo, debido al amplio estudio realizado de *CD46*, la comparación de las frecuencias de los haplotipos hallados entre respondedores y no respondedores a IFN $\beta$  reveló diferencias significativas para dos de los haplotipos formados por los 5 SNPs (Tabla 50).

Tabla 50. Haplotipos de *CD46* más frecuentes observados en nuestra población, obtenidos con la estimación del algoritmo de Expectación-Maximización a partir de enfermos respondedores y no respondedores a IFN $\beta$ . Orden de los SNPs 5'→3'.

Haplotipos <i>CD46</i>	Respondedores (N=122)		No Respondedores (N=161)		P
	n	%	n	%	
ATTTA	43	35	58	36	0,9
GACGG	24	20	37	23	0,5
ATCTA	10	8	15	9	0,11
AACTA	15	12	17	11	0,64
GA CTG	14	12	18	11	0,93
GTCTA	10	8	7	4	0,17
AACTG	1	1	8	5	<b>0,04</b>
AATTA	5	4	1	1	<b>0,05</b>
P=0,18. $\chi^2=10,08$					

El efecto encontrado no soporta corrección, sin embargo, el haplotipo que aparece asociado con mayor intensidad (AACTG) es el mismo que marcaba diferencias fenotípicas en la EM. Si bien hasta la fecha no se ha descrito una relación directa entre *CD46* e IFN $\beta$ , se ha visto que la producción de IL-10 disminuye bajo la estimulación de *CD4*, lo que puede ser responsable, al menos en parte, de las alteraciones de la diferenciación de las Treg observadas en la EM<sup>299 438</sup>. Por otro lado se ha visto un incremento de diferenciación de LT hacia Treg en ratones tratados con IFN $\beta$ <sup>388</sup>. Así, a pesar de que el efecto obtenido pueda deberse al azar, y que este gen no haya mostrado asociación en los estudios de barrido genómico para el tratamiento de EM con IFN $\beta$ <sup>208 212</sup>, sería interesante replicar el estudio en una cohorte mayor de enfermos tratados con IFN $\beta$  y analizar en profundidad las posibles relaciones funcionales entre *CD46* y este fármaco.

### III. CD40

La comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario, mostró diferencias significativas para portadores del alelo minoritario del SNP rs1883832 (Tabla 51).

Tabla 51. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para el polimorfismo rs1883832 de *CD40* en enfermos respondedores y no respondedores a IFN $\beta$ .

Respuesta IFN $\beta$ <i>CD40</i> rs1883832 C/T		Respondedores (N=59)		No Respondedores (N=79)		p	
		n	%	n	%		
Genotípicas	TT	8	14	9	11	0,11	$\chi^2=4,32$
	TC	30	51	28	35		
	CC	21	36	42	56		
Alélicas	T	46	39	46	29	0,08	
	C	72	61	112	71		
	TT+CT	38	64	37	47	0,04	
	CC	21	36	42	53		

El IFN $\beta$  induce la expresión de moléculas coestimuladoras, entre ellas el CD40, tanto *in vitro*<sup>439</sup> como *in vivo*<sup>44 440</sup>. Este aumento de expresión se produce en monocitos y actúa sobre la maduración de oligodendrocitos y su expresión de moléculas coestimuladoras<sup>441</sup>. El aumento de la expresión de CD40 en enfermos de EM tratados con IFN $\beta$  se ha asociado a la respuesta terapéutica, de forma que la ausencia de cambio en la expresión de CD40 se traduce en falta de respuesta terapéutica<sup>44</sup>. Ante estas evidencias funcionales de la relación entre CD40 e IFN, no sorprende encontrar relación entre la respuesta y la variabilidad genética del mismo, a pesar de que ésta no haya sido descrita en ningún estudio de barrido genómico de respuesta a IFN $\beta$  en la EM. Este hecho podría deberse a una baja cobertura de la región, la selección de SNPs con insuficiente DL para detectar el efecto con el locus implicado o a la desestimación de efectos de baja intensidad al aplicar corrección estadística. Dado que los portadores del alelo de menor frecuencia responden a tratamiento, sería interesante comprobar si en aquellos pacientes que responden a tratamiento en los que se observa un incremento de CD40, está presente este alelo. En cualquier caso se hace necesario un análisis más amplio del *CD40* para determinar su efecto en el tratamiento, ya que, no podemos descartar que este SNP marque la región con alto DL en que está localizado *CD40*, pero podría estar resaltando el efecto de un gen próximo a *CD40*.

#### IV. GPC5

La comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre carriers, mostró diferencias significativas con 2 de los SNPs (Tabla 70), pero no para el SNP rs9523554 (datos no mostrados).

Tabla 52. Comparación de las frecuencias genotípicas, alélicas y entre portadores del alelo minoritario para los SNPs rs10492503 y rs1411751 de *GPC5* en enfermos respondedores y no respondedores a

Respuesta IFN $\beta$ <i>GPC5</i>		Respondedores		No Respondedores		p	
		n	%	N	%		
rs10492503 A/T		(N=58)		(N=79)		0,03	$\chi^2=6,92$
Genotípicas	TT	2	3	10	13		
	AT	17	29	32	41		
	AA	39	67	37	47		
Alélicas	T	21	18	52	33	0,006	
	A	95	82	106	67		
	Portador T	19	33	42	53	0,017	
	No portador T	39	67	37	47		
rs1411751 C/T		(N=65)		(N=80)		0,004	$\chi^2=0,72$
Genotípicas	TT	0	0	4	5		
	CT	10	15	27	34		
	CC	55	85	49	61		
Alélicas	T	10	8	35	22	0,0009	
	C	120	92	125	78		
	Portador T	10	15	31	39	0,001	
	No portador T	55	85	49	61		

IFN $\beta$ .

Los glipicanos han mostrado una capacidad coadyuvante en la señalización de citoquinas<sup>417</sup>. Ampliamente estudiada ha sido su capacidad de unión a miembros de la superfamilia TGF $\beta$ <sup>418</sup>, de ahí la idea de que el *GPC5* pudiese intervenir en la unión de IFN $\beta$  a su receptor, y por tanto, polimorfismos de este gen pudieran influenciar la respuesta a este tratamiento.



La asociación entre *GPC5* e IFN $\beta$  en el tratamiento de la EM, ha sido demostrada en un estudio de barrido genómico<sup>210</sup> y replicada en población española<sup>419</sup>.

El efecto encontrado aquí para el rs10492503 es el mismo que el observado en los dos análisis previos<sup>210 419</sup>, de forma que portar el alelo de menor frecuencia favorece la respuesta a IFN $\beta$ . Mismo efecto que el observado para el rs1411751 y que también ha sido descrito<sup>419</sup> y que además, ha mostrado asociación al fenotipo de la EM.

Está claro que la región donde se ubican estos SNPs está asociada a la respuesta a tratamiento, pero no podemos asegurar que el responsable de esta asociación sea el *GPC5* (aunque parece el más probable), debido a la amplitud de la región analizada. Sin embargo, el *GPC5* forma extensas redes en las placas de esclerosis de EM y podrían estar implicados en el secuestro de quimioquinas proinflamatorias<sup>422</sup>, además intervienen en la neurogénesis<sup>420 421</sup>. Es posible, que al igual que ocurre para el IFN $\gamma$ <sup>442</sup>, el IFN $\beta$  afecte a la expresión de los glipicanos. Por otro lado el IFN $\beta$  inhibe in vitro las metaloproteinasas<sup>443 444</sup>, elementos de la matriz extracelular al igual que los glipicanos. Así, una alteración de la matriz extracelular podría interferir en la acción del IFN $\beta$ .

Es necesario un análisis más profundo de esta región cromosómica, para determinar si el polimorfismo estudiado es el verdadero responsable del efecto observado.

## V. Resto de genes analizados (*TNFRSF6B*, *TNFRSF14*, *IL27*, *Foxp3* y *PODXL*)

Todos ellos son buenos candidatos para el estudio de respuesta al tratamiento con IFN $\beta$  en EM.

La ruta de señalización IFN tipo I, que entre otros es inducida por TNF, activa mecanismos de acción antiviral y se ha demostrado su efecto frente a los herpes virus<sup>445</sup>. Si tenemos en cuenta que *TNFRSF14* es un mediador de entrada de HVS, y que ha demostrado asociación con la presencia de HHV6 en EM<sup>324</sup>, cabe esperar que tenga influencia, también en la respuesta al tratamiento con IFN $\beta$ .

El *TNFRSF6B* tiene capacidad de suprimir la acción de Th17<sup>335</sup>, y el IFN $\beta$  reduce los efectos proinflamatorios de LT CD4+ a través de la inhibición de Th17, por ello sería factible que *TNFRSF6B* tuviera un papel en la respuesta al tratamiento de la EM con IFN $\beta$ .

Se ha demostrado que en ratones con EAE el IFN $\beta$  es mediador de la producción de IL-27 y que este hecho es crucial para que el IFN $\beta$  ejerza su efecto inmunorregulatorio<sup>372</sup>. Así *IL27* se convierte en un gran candidato para estar implicado en el tratamiento de EM con IFN $\beta$ .

Muy recientemente se ha visto que en los pacientes RR de EM tratados con IFN $\beta$  los niveles de LT IFN $\gamma$ +Foxp3+ se regulan alcanzando niveles similares a los de individuos sanos<sup>446</sup>, esto hace interesante el análisis de FoxP3 en su relación con el tratamiento de EM con IFN $\beta$ .

Niveles elevados de *PODXL* se asocian a mayor capacidad invasiva de células cancerosas<sup>447</sup> y es posible que su capacidad para regular la migración no afecte solo a células cancerosas, sino también a células del SI como los LTCD4+ o las Treg, ambas de gran importancia en la EM y sobre las que actúa el IFN $\beta$ . La *PODXL* es aún una gran desconocida, pero se sabe que tiene efecto sobre la neurogénesis<sup>425</sup>; por tanto, es posible que intervenga en alguno de los aspectos de la EM.

Ninguno de estos genes ha mostrado asociación a la respuesta al tratamiento con IFN $\beta$ . Esto puede deberse a la baja potencia estadística, pero ninguno de ellos ha sido asociado a la respuesta a tratamiento en los estudios de barrido farmacogenómico<sup>208 212</sup>. Esto sugiere que efectivamente estos genes no están asociados a respuesta a IFN $\beta$  al menos en la EM. Pero dada la relación funcional que han mostrado algunos de ellos con IFN $\beta$ , y que los

criterios aplicados para determinar la respuesta a tratamiento son estrictos y han sido criticados por algunos autores<sup>205 448</sup>, quizá estaría indicado un estudio más amplio o en una cohorte mayor para afirmar que la variabilidad genética de estos genes no está implicada en este aspecto de la EM.

El efecto beneficioso de IFN $\beta$  en el tratamiento de pacientes RR con EM ha sido claramente demostrado<sup>7 440</sup>; sin embargo, el efecto es solo parcial y existe un número relevante de pacientes que no responden. Además, actualmente no se dispone de marcadores clínicos, inmunológicos, radiológicos ni genéticos que permitan predecir la respuesta. Ante este panorama, la identificación de polimorfismos genéticos representa un nuevo campo de estudio en el que no solo se puede ampliar el conocimiento de los mecanismos de acción del IFN $\beta$ , sino que pueden aparecer nuevos marcadores que ayuden a predecir la respuesta al tratamiento. Sin embargo, no hay que olvidar que los resultados obtenidos requieren replicación en estudios prospectivos de cohortes más amplias y una validación funcional para su aceptación como marcadores de respuesta. Todo ello para acercarnos al paradigma del tratamiento individualizado.

Es probable, dada la naturaleza multifactorial de la EM y la complejidad del papel del IFN en el SI, que para la consecución de este objetivo sean necesarios análisis que integren no sólo información genética, sino también información clínica, inmunológica, bioquímica y radiológica.

*"La conclusión es que sabemos muy poco y sin embargo es asombroso lo mucho que conocemos".*

*Bertrand Russell (1872-1970)*



# Conclusiones

## A. Genes Analizados

1. **TLR4.** El primer tagging de *TLR4* realizado en el contexto de la EM muestra que *TLR4* no parece ser un determinante directo en la susceptibilidad de la EM, ni en los distintos aspectos de la EM estudiados.

2. **CD46.** El primer tagging de *CD46* realizado en el contexto de la EM indica que *CD46* está asociado a predisposición a EM, a una forma más tardía de inicio de la misma y a una progresión más lenta de la misma. Además, presenta epistasis con el alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01* para el desarrollo de EM.

3. **TNFRSF14.** El SNP rs6684865 de *TNFRSF14* está asociado a un incremento de susceptibilidad a EM y está relacionado con la infección activa por HHV6 en pacientes con EM.

4. **TNFRSF6B.** El SNP rs4809330 de *TNFRSF6B* está asociado a la predisposición a EM y los portadores del alelo minoritario de este SNP presentan mayor susceptibilidad a una forma clínica más severa de la EM (PP).

Existe un efecto conjunto de alelos de susceptibilidad del rs6684865 de *TNFRSF14* y del rs4809330 de *TNFRSF6B* que provoca mayor susceptibilidad a EM que el efecto individual de cada uno.

5. **CD40.** El rs1883832 de *CD40* está asociado con la susceptibilidad a EM.

**6. *Foxp3*.** El primer tagging de *Foxp3* realizado en el contexto de la EM indica que está asociado a predisposición a EM (asociación mayor en mujeres) y presenta epistasis con el alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01* para el desarrollo de EM en el grupo de los hombres.

**7. *GPC5*.** El SNP rs9523554 de *GPC5* está asociado con la susceptibilidad a EM y presenta epistasis con el alelo de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01* para el desarrollo de EM. El SNP rs10492503 de *GPC5* protege frente a la presentación infantil de EM.

**8. *IL27* y *PODXL*.** Ni el SNP rs9550642 de *IL27*, ni el SNP rs1477226 de *PODXL* parecen ser determinantes directos en la susceptibilidad de la EM ni en los distintos aspectos de la EM estudiados.

- El SI está implicado en la EM como ha quedado patente en esta tesis donde se han mostrado nuevas asociaciones de elementos del SI con la EM (*CD46* y *Foxp3*) y se han replicado asociaciones ya descritas (*TNFRS14*, *TNFRSF6B*, *CD40* y *GPC5*). Así como asociación de estos genes a distintos aspectos fenotípicos de esta enfermedad.

- Estos elementos del SI constituyen no sólo marcadores de susceptibilidad y de fenotipo, sino que debido a sus funciones son potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la EM.

## B. Farmacogenética

I. **TLR4** y **CD46**. Ciertos haplotipos están asociados a la respuesta a tratamiento de EM con INF $\beta$ .

II. **CD40** y **GPC5**. SNPs asociados a la respuesta a tratamiento de EM con INF $\beta$  (resultado replicado para *GPC5*).

III. **Resto de genes analizados (TNFRSF6B, TNFRSF14, IL27, Foxp3 y PODXL)**. Ninguno parece estar asociado a la respuesta al tratamiento de EM con INF $\beta$ .

- Está claro que algunos de los genes analizados están implicados en la respuesta a tratamiento con INF $\beta$ . Así, hemos mostrado nuevas asociaciones (*TLR4* y *CD40*) y se han replicado otras ya descritas (*GPC5*).

- Estos hallazgos permiten avanzar en el objetivo de identificar nuevos marcadores de respuesta que permitan instaurar un tratamiento adecuado y crear algoritmos de predicción de respuesta que puedan ser tenidos en cuenta a la hora de tomar una decisión terapéutica y lograr el objetivo de una terapia individualizada.









# Agradecimientos

Esta tesis no podría haber existido sin la existencia de muchas personas, a las que quiero agradecer su apoyo, colaboración, guía, oportunidad...y a muchas su amistad.

Espero no olvidarme de nadie (perdón de antemano, ya sabéis la cabeza desastre que puedo llegar a tener)

Por dónde empezar, pues creo que por lo habitual

A personas imprescindibles

A mama, papa (o viceversa) gracias por darme lo que tengo, por apoyarme (y exigirme), por estar ahí y por dejarme y enseñarme a ser (y discernir), pero sobre todo gracias por ser vosotros (Gwendoline Kelly y Miguel Ángel Blanco Fernández) y por haber dado todo por mi hermana y por mí.

A mi hermana por ver el mundo con otros ojos y enseñarme a ver, por quererme a pesar de “hacer demasiado de hermana mayor”. Brenda, sigue mirando el mundo, que con tu mirada es un sitio mejor.

A Rodrigo, por aparecer de la nada y haberse quedado conmigo, además de, estar siempre ahí, solucionarme las peleas con el Word, el Excel, el PDF, en realidad con Windows y demás ítems informáticos, cocinar, aguantar mis borderías, ser guapo, inteligente...en fin; yo me quedo contigo.

A mi abuela, por luchadora incansable y por ser la persona más dura que conozco. Felices 100 años (y los que quedan).

A Esther por abrirme los ojos cuando lo necesitaba, y estar ahí desde hace más de 15 años.

A Conchi, esta tesis es para ti.

A Jezabel por qué sin ti (y es un hecho) jamás hubiese acabado la tesis, pero no sólo por eso, sino por ser mi amiga y profesora y ser unas de esas personas que te encuentras en el camino y quieres que sigan en él contigo. Gracias.

A mis “co-erres” Atocha y Carmen C., por ser como sois, no sabéis lo que me has enseñado y lo que he agradecido que estuvieseis ahí (y espero que sigáis). Gracias.

A M<sup>a</sup> José T. por ser una excelente profesional, por dar sentido a la residencia y por ser mi amiga. Gracias.

A Dani por enseñarme a vivir. Gracias por convertir el mundo en poesía.

A Ana G, a Salo, a Jai, a Belén, a Cuqui, a Victor, a Dani, a Itzi, a Clara, a Olga F, a Sara, a Rocío, a Nacho, ... por ser como sois.

A Carmen por ser “una borde exigente” y por enseñarme a caminar sola en el mundo del tesinando. Gracias

A IFMSA-Complutense, IFMSA-Spain, IFMSA y todos los miembros de la misma que he conocido (en especial a Oriana y Susana), por hacer que la medicina sea algo más que un montón de libros y exámenes. Gracias por hacer que la medicina sea lo que es.

A Colegio Estilo por enseñarnos el mundo más allá de lo establecido. Gracias Josefina Aldecoa y curso del 92 (Amanda, Almudena, María, Laura, Gabriela, Lola, Emilio, Jorge S, Aitor, Samuel, Pablo D, Carmen, Jaime, Ignacio, Jorge V, Itziar, Álvaro, Lola, Pablo M, Manuel, Pablo V, Inés, Ana G, ...)

A watabata por quitarme (al menos en parte) el miedo escénico, por darme la oportunidad de (aunque mala) ser actriz.

A personas imprescindibles en el “trabajo”

A Trinidad Caldés por enviarme a Inmuno (al principio fue duro) y darme la oportunidad de que esta tesis existiese.

A Emilio GC por dejarme ser una intrusa. Gracias por dejarme (y facilitarme) hacer la tesis en tu departamento.

A Elena por hacerme pipetear infinitos SNPs de infinitos genes y frustrarme con la estadística. Gracias por hacerme pensar y trabajar como un becario (aunque no sé si hubiese preferido una tesis de médico). Gracias, estoy orgullosa de mi trabajo.

A Miguel F. por enseñarme el manejo de los instrumentos y enseñarme que para que las cosas sean válidas hay que hacerlas bien.

A Susi L. por enseñarme citogenética (sin la base lo demás no se entiende). Gracias.

A Isabel L. por ser una excelente compañera y amiga y por hacerme ver todos los días que la genética merece la pena.

A C. Ayuso y C. Ramos por darme la oportunidad de ser Médico Genetista (seguiremos peleando por que se reconozca la especialidad), la razón por la que hice medicina. Gracias.

A Marta C. por ser una genial investigadora, por luchadora y trabajadora incansable. Gracias por demostrarme que la investigación (bien hecha) sigue siendo imprescindible.

A Mariajo por creer en lo que hace y por mostrarme los entresijos de la Genética Clínica. Gracias.

A Laura, Luisa, Patricia, Paula y Vanesa por ser unas “erres” pequeñas geniales, por los cafés y las cañas, por el lexatin, por los congresos, en fin por todo. Gracias.

A Amparo, Jorge y Elvira por hacerme un huequito en Micro. Gracias.

A Berta, a Mónica, a Diego y a Ruth por estar ahí, no sabéis lo que me habéis ayudado. Gracias

A mis antiguas jefas y jefes del clínico por enseñarme que el laboratorio es mucho más que números y unidades. Gracias.

A las y los técnicos del Laboratorio de Análisis Clínicos de mañana y las de guardias por tener paciencia y enseñarme (y salvarme de algún marrón). Gracias

A todos mis compañeros de la FJD por tener paciencia y enseñar a una recién llegada que estaba más perdida que una aguja en un pajar. Gracias.

A más personas imprescindibles

To Elizabeth Terry, my grandmother, for her strength and courage.

To Miriam Kelly, my godmother, for being a second mother abroad. Thank you

A Pedro Blanco Fernández, mi padrino, por su apoyo moral y logístico. Gracias.

To Peter Kelly, for his rebelliousness. Thank you.

To Tony Kelly, for always being there. Thank you.

To Cyril Kelly for letting me be another member of his family. Thank you.

To Caitriona Kelly, for being so loving. Thank you

A Jenny Worsley y Carlos Saez por hacerme sentir como una hija más. Gracias.

A Jorge Saez, Patricia Saez, Alex Saez, Diego Saez y Marcelo Saez por convertirme en la 7ª hermana.

To Oliver Kelly, Patrick Kelly and Ted (Edmund). Thank you

A Paola y a Rafa. Gracias.

*A TODOS POR HACER QUE ESTE TRAMO DEL CAMINO, DE SUDOR Y LÁGRIMAS, HAYA  
LLEGADO A BUEN PUERTO. GRACIAS*

*Caminante, no hay camino,*

*se hace camino al andar.*







## Bibliografía

1. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. 1995;377(6545):150-1.
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(13):938-52.
3. Mallada J. Epidemiología de la Esclerosis múltiple en España. Datos de prevalencia e incidencia, 2007.
4. Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain*. 2007;130(Pt 11):2789-99. Epub 007 Sep 21.
5. Stadelmann C, Albert M, Wegner C, Bruck W. Cortical pathology in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2008;21(3):229-34.
6. Geurts JJ, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7(9):841-51.
7. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46(4):907-11.
8. Tremlett H, Yinshan Z, Devonshire V. Natural history of secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14(3):314-24.
9. Bakshi R, Minagar A, Jaisani Z, Wolinsky JS. Imaging of multiple sclerosis: role in neurotherapeutics. *NeuroRx* 2005;2(2):277-303.
10. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50(1):121-7.
11. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-17.

12. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63(1):16-25.
13. Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H, et al. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2007;17(1):38-44.
14. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 2004;55(4):458-68.
15. Aboul-Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Bruck W, et al. Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62(1):25-33.
16. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Res Bull* 2003;61(3):321-6.
17. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357(9):851-62.
18. Thorpe JW, Mumford CJ, Compston DA, Kendall BE, MacManus DG, McDonald WI, et al. British Isles survey of multiple sclerosis in twins: MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(4):491-6.
19. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993;33(3):281-5.
20. Sadovnick AD, Yee IM, Guimond C, Reis J, Dymont DA, Ebers GC. Age of onset in concordant twins and other relative pairs with multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 2009;170(3):289-96.
21. Young CA. Factors predisposing to the development of multiple sclerosis. *Qjm* 2011.
22. Sellner J, Kraus J, Awad A, Milo R, Hemmer B, Stuve O. The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis--a critical analysis of potential environmental factors. *Autoimmun Rev* 2011;10(8):495-502.

23. Winer S, Astsaturon I, Cheung RK, Schrade K, Gunaratnam L, Wood DD, et al. T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice. *J Immunol* 2001;166(7):4751-6.
24. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007;79:127-47.
25. Belogurov AA, Jr., Kurkova IN, Friboulet A, Thomas D, Misikov VK, Zakharova MY, et al. Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis. *J Immunol* 2008;180(2):1258-67.
26. Trapp BD. Pathogenesis of multiple sclerosis: the eyes only see what the mind is prepared to comprehend. *Ann Neurol* 2004;55(4):455-7.
27. Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Curr Opin Neurol* 2008;21(3):242-7.
28. Haines JD, Inglese M, Casaccia P. Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med* 2011;78(2):231-43.
29. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001;58(1):65-70.
30. Casanova-Estruch B, Coret-Ferrer F, Landete L, Burgal M. [Axonal involvement in multiple sclerosis. Current concepts]. *Rev Neurol* 2000;30(10):972-6.
31. Bruck W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2005;252 Suppl 5:v10-5.
32. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8(9):913-9.
33. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010;129(2):154-69.
34. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998;102(5):1045-50.

35. Ritchie AM, Gilden DH, Williamson RA, Burgoon MP, Yu X, Helm K, et al. Comparative analysis of the CD19+ and CD138+ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 2004;173(1):649-56.
36. Peterson LK, Tsunoda I, Libbey JE, Fujinami RS. Role of B:T cell ratio in suppression of clinical signs: a model for silent MS. *Exp Mol Pathol* 2008;85(1):28-39.
37. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004;14(2):164-74.
38. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007;130(Pt 4):1089-104.
39. Wucherpfennig KW, Catz I, Hausmann S, Strominger JL, Steinman L, Warren KG. Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *J Clin Invest* 1997;100(5):1114-22.
40. Von Budingen HC, Hauser SL, Ouallet JC, Tanuma N, Menge T, Genain CP. Frontline: Epitope recognition on the myelin/oligodendrocyte glycoprotein differentially influences disease phenotype and antibody effector functions in autoimmune demyelination. *Eur J Immunol* 2004;34(8):2072-83.
41. Walsh MJ, Tourtellotte WW, Roman J, Dreyer W. Immunoglobulin G, A, and M--clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum--analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;35(3):313-27.
42. Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM, et al. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002;105(3):158-63.
43. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Bluestone JA, Miller SD. Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 1998;89(1-2):10-8.
44. Wiesemann E, Deb M, Trebst C, Hemmer B, Stangel M, Windhagen A. Effects of interferon-beta on co-signaling molecules: upregulation of CD40, CD86 and PD-L2 on monocytes

- in relation to clinical response to interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14(2):166-76.
45. Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:491-505.
46. Zhang J, Weiner HL, Hafler DA. Autoreactive T cells in multiple sclerosis. *Int Rev Immunol* 1992;9(3):183-201.
47. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004;172(6):3893-904.
48. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, et al. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 2000;191(8):1395-412.
49. Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991;38(1):1-15.
50. Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M. The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2007;191(1-2):51-60.
51. Kroenke MA, Segal BM. Th17 and Th1 responses directed against the immunizing epitope, as opposed to secondary epitopes, dominate the autoimmune repertoire during relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2007;85(8):1685-93.
52. Katzman SD, Gallo E, Hoyer KK, Abbas AK. Differential requirements for Th1 and Th17 responses to a systemic self-antigen. *J Immunol* 2011;186(8):4668-73.
53. Saresella M, Marventano I, Longhi R, Lissoni F, Trabattoni D, Mendozzi L, et al. CD4+CD25+FoxP3+PD1- regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *Faseb J* 2008;22(10):3500-8.
54. Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2010;16(2):58-68.

55. Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009;183(11):7602-10.
56. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 2004;103(11):4222-31.
57. Saxena A, Bauer J, Scheikl T, Zappulla J, Audebert M, Desbois S, et al. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol* 2008;181(3):1617-21.
58. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123 ( Pt 6):1174-83.
59. Friese MA, Jakobsen KB, Friis L, Etzensperger R, Craner MJ, McMahon RM, et al. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med* 2008;14(11):1227-35.
60. Hammond KJ, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2003;15(6):683-9.
61. Demoulin T, Gachelin G, Bequet D, Dormont D. A biased V $\alpha$ 24+ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett* 2003;90(2-3):223-8.
62. Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 2003;15(2):279-88.
63. Vandenberg AA, Huan J, Agotsch M, La Tocha D, Goelz S, Offner H, et al. Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;215(1-2):125-8.
64. Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA. Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(10):4588-92.

65. Battistini L, Salvetti M, Ristori G, Falcone M, Raine CS, Brosnan CF. Gamma delta T cell receptor analysis supports a role for HSP 70 selection of lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Mol Med* 1995;1(5):554-62.
66. Rajan AJ, Gao YL, Raine CS, Brosnan CF. A pathogenic role for gamma delta T cells in relapsing-remitting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. *J Immunol* 1996;157(2):941-9.
67. Smorodchenko A, Wuerfel J, Pohl EE, Vogt J, Tysiak E, Glumm R, et al. CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology. *Eur J Neurosci* 2007;26(6):1387-98.
68. Lees JR, Archambault AS, Russell JH. T-cell trafficking competence is required for CNS invasion. *J Neuroimmunol* 2006;177(1-2):1-10.
69. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2005;11(3):328-34.
70. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 2009;41(7):824-8.
71. Codarri L, Fontana A, Becher B. Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation. *Curr Opin Neurol* 2010;23(3):205-11.
72. Navarro J, Aristimuno C, Sanchez-Ramon S, Vigil D, Martinez-Gines ML, Fernandez-Cruz E, et al. Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol* 2006;176(1-2):153-61.
73. Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4(7):384-98.
74. Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001;124(Pt 3):480-92.
75. Huang YM, Xiao BG, Ozenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Fredrikson S, et al. Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol* 1999;99(1):82-90.



76. Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007;179(5):3268-75.
77. Ingram G, Hakobyan S, Robertson NP, Morgan BP. Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker. *Clin Exp Immunol* 2009;155(2):128-39.
78. Vanguri P, Shin ML. Activation of complement by myelin: identification of C1-binding proteins of human myelin from central nervous tissue. *J Neurochem* 1986;46(5):1535-41.
79. Rus H, Cudrici C, David S, Niculescu F. The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity* 2006;39(5):395-402.
80. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006;176(2):705-10.
81. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002;3(10):944-50.
82. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007;178(6):3447-56.
83. Montero E, Nussbaum G, Kaye JF, Perez R, Lage A, Ben-Nun A, et al. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun* 2004;23(1):1-7.
84. Yu P, Gregg RK, Bell JJ, Ellis JS, Divekar R, Lee HH, et al. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol* 2005;174(11):6772-80.
85. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199(7):971-9.
86. Haas J, Fritzsche B, Trubswetter P, Korpö M, Milkova L, Fritz B, et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;179(2):1322-30.
87. Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 2005;81(1):45-52.

88. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 2007;8(1):74-83.
89. Julia E, Montalban X, Al-Zayat H, Issazadeh-Navikas S, Goertsches R, Martin R, et al. Deficient Fas expression by CD4+ CCR5+ T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;180(1-2):147-58.
90. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7(9):929-36.
91. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(4):291-301.
92. Fernandez O, Luque G, San Roman C, Bravo M, Dean G. The prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Velez-Malaga, southern Spain. *Neurology* 1994;44(3 Pt 1):425-9.
93. Uria DF, Abad P, Calatayud MT, Virgala P, Diaz A, Chamizo C, et al. Multiple sclerosis in Gijon health district, Asturias, northern Spain. *Acta Neurol Scand* 1997;96(6):375-9.
94. Ares B, Prieto JM, Lema M, Dapena D, Arias M, Noya M. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 2007;13(2):262-4.
95. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2006;5(11):932-6.
96. Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Sadovnick AD, et al. Parent-of-origin effects in MS: observations from avuncular pairs. *Neurology* 2008;71(11):799-803.
97. Sadovnick AD, Baird PA. The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology* 1988;38(6):990-1.
98. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Kyvik KO, Bronnum-Hansen H. Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Mult Scler* 2005;11(5):500-3.
99. Lindsey JW. Familial recurrence rates and genetic models of multiple sclerosis. *Am J Med Genet A* 2005;135(1):53-8.

100. Lettre G, Rioux JD. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2008;17(R2):R116-21.
101. Barcellos LF, Kamdar BB, Ramsay PP, DeLoa C, Lincoln RR, Caillier S, et al. Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. *Lancet Neurol* 2006;5(11):924-31.
102. Gupta G, Gelfand JM, Lewis JD. Increased risk for demyelinating diseases in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;129(3):819-26.
103. Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A, Teruel M, Diaz-Gallo LM, Gomez-Garcia M, et al. CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. *PLoS One* 2010;5(7):e11520.
104. Nielsen NM, Westergaard T, Frisch M, Rostgaard K, Wohlfahrt J, Koch-Henriksen N, et al. Type 1 diabetes and multiple sclerosis: A Danish population-based cohort study. *Arch Neurol* 2006;63(7):1001-4.
105. WHO Ma. Atlas Multiple Sclerosis resources in the world 2008, 2008.
106. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005;366(9490):1036-44.
107. Hermanowski J, Bouzigon E, Forabosco P, Ng MY, Fisher SA, Lewis CM. Meta-analysis of genome-wide linkage studies for multiple sclerosis, using an extended GSMA method. *Eur J Hum Genet* 2007;15(6):703-10.
108. Huizinga TW, Pisetsky DS, Kimberly RP. Associations, populations, and the truth: recommendations for genetic association studies in Arthritis & Rheumatism. *Arthritis Rheum* 2004;50(7):2066-71.
109. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409(6822):928-33.
110. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2002;3(4):299-309.
111. de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005;37(11):1217-23.
112. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001;29(2):229-32.

113. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun* 2009;10(1):5-10.
114. Refining genetic associations in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7(7):567-9.
115. Habek M, Brinar VV, Borovecki F. Genes associated with multiple sclerosis: 15 and counting. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(7):857-61.
116. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 2004;5(12):889-99.
117. Kaur NKMaG. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Expert reviews in molecular medicine*. Cambridge University Press 2003;5 (24).
118. Dymment DA, Sadovnick AD, Ebers GC. Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 1997;6(10):1693-8.
119. Jersild C, Svejgaard A, Fog T, Ammitzboll T. HL-A antigens and diseases. I. Multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1973;3(4):243-50.
120. de la Concha EG, Arroyo R, Crusius JB, Campillo JA, Martin C, Varela de Seijas E, et al. Combined effect of HLA-DRB1\*1501 and interleukin-1 receptor antagonist gene allele 2 in susceptibility to relapsing/remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997;80(1-2):172-8.
121. Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, Thomsen AR, et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 2006;443(7111):574-7.
122. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007;61(3):228-36.
123. Wucherpfennig KW. The structural interactions between T cell receptors and MHC-peptide complexes place physical limits on self-nonself discrimination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;296:19-37.
124. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet* 2007;3(9):1607-13.

125. Cree BA, Reich DE, Khan O, De Jager PL, Nakashima I, Takahashi T, et al. Modification of Multiple Sclerosis Phenotypes by African Ancestry at HLA. *Arch Neurol* 2009;66(2):226-33.
126. Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, Goodin DS, Baranzini SE, Beheshtian A, et al. Genotype-Phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 2009;132(Pt 1):250-9.
127. Cournu-Rebeix I, Genin E, Leray E, Babron MC, Cohen J, Gout C, et al. HLA-DRB1\*15 allele influences the later course of relapsing remitting multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008;9(6):570-4.
128. Chao MJ, Ramagopalan SV, Herrera BM, Lincoln MR, Dymment DA, Sadovnick AD, et al. Epigenetics in multiple sclerosis susceptibility: difference in transgenerational risk localizes to the major histocompatibility complex. *Hum Mol Genet* 2009;18(2):261-6.
129. McElroy JP, Oksenberg JR. Multiple sclerosis genetics 2010. *Neurol Clin* 2011;29(2):219-31.
130. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC. Factors influencing sib risks for multiple sclerosis. *Clin Genet* 2000;58(6):431-5.
131. Chao MJ, Herrera BM, Ramagopalan SV, Deluca G, Handunnetthi L, Orton SM, et al. Parent-of-origin effects at the major histocompatibility complex in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2010;19(18):3679-89.
132. Knudsen GP, Harbo HF, Smestad C, Celius EG, Akesson E, Oturai A, et al. X chromosome inactivation in females with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007;14(12):1392-6.
133. Schumacher A, Petronis A. Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;310:81-115.
134. Gray SG, Dangond F. Rationale for the use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic modality in multiple sclerosis. *Epigenetics* 2006;1(2):67-75.
135. Zika E, Ting JP. Epigenetic control of MHC-II: interplay between CIITA and histone-modifying enzymes. *Curr Opin Immunol* 2005;17(1):58-64.

136. Hamilton TH. Control by estrogen of genetic transcription and translation. Binding to chromatin and stimulation of nucleolar RNA synthesis are primary events in the early estrogen action. *Science* 1968;161(842):649-61.
137. Popko B. Epigenetic control of myelin repair. *Nat Neurosci* 2008;11(9):987-8.
138. Baranzini SE, Mudge J, van Velkinburgh JC, Khankhanian P, Khrebtukova I, Miller NA, et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature* 2010;464(7293):1351-6.
139. Lincoln JA, Cook SD. An overview of gene-epigenetic-environmental contributions to MS causation. *J Neurol Sci* 2009;286(1-2):54-7.
140. Simon K, Yang X, Munger K, Ascherio A. Variation in the Epstein-Barr virus receptor, CR2, and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13(7):947-8.
141. Costenbader KH, Gay S, Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: Which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev* 2011.
142. Coo H, Aronson KJ. A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 2004;23(1-2):1-12.
143. Poser CM. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Ann Neurol* 1994;36 Suppl 2:S231-43.
144. Sawcer S, Compston A. The genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans: concepts and design. *J Neuroimmunol* 2003;143(1-2):13-6.
145. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7(3):268-77.
146. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 2007;61(6):504-13.
147. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol* 2007;254(4):471-7.
148. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dymment DA, et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 2009;5(2):e1000369.

149. Swanborg R, Whittum-Hudson J, Hudson A. Infectious agents and multiple sclerosis--are *Chlamydia pneumoniae* and human herpes virus 6 involved? *J Neuroimmunol* 2003;136(1-2):1-8.
150. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity* 2006;39(1):9-19.
151. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 2010;9(5):A387-94.
152. Pugliatti M, Riise T, Sotgiu MA, Satta WM, Sotgiu S, Pirastru MI, et al. Evidence of early childhood as the susceptibility period in multiple sclerosis: space-time cluster analysis in a Sardinian population. *Am J Epidemiol* 2006;164(4):326-33.
153. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(4):382-427.
154. Fleming J, Fabry Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007;61(2):85-9.
155. Fleming JO, Cook TD. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology* 2006;67(11):2085-6.
156. Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005;4(3):195-202.
157. Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. *J Autoimmune Dis* 2006;3:1.
158. Ascherio A, Munger KL. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clin Exp Immunol* 2010;160(1):120-4.
159. Kikutani H. Molecular mechanisms involved in regulation of immune responses. In: University O, editor, 2009.
160. Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenenbaum S, Ness J, et al. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007;6(9):773-81.

161. De Jager PL, Simon KC, Munger KL, Rioux JD, Hafler DA, Ascherio A. Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;70(13 Pt 2):1113-8.
162. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *Jama* 2005;293(20):2496-500.
163. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 2006;63(6):839-44.
164. Lunemann JD, Edwards N, Muraro PA, Hayashi S, Cohen JL, Munz C, et al. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2006;129(Pt 6):1493-506.
165. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005;115(5):1352-60.
166. Miller SD, Katz-Levy Y, Neville KL, Vanderlugt CL. Virus-induced autoimmunity: epitope spreading to myelin autoepitopes in Theiler's virus infection of the central nervous system. *Adv Virus Res* 2001;56:199-217.
167. Voo KS, Peng G, Guo Z, Fu T, Li Y, Frappier L, et al. Functional characterization of EBV-encoded nuclear antigen 1-specific CD4+ helper and regulatory T cells elicited by in vitro peptide stimulation. *Cancer Res* 2005;65(4):1577-86.
168. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007;204(12):2899-912.
169. Kong H, Baerbig Q, Duncan L, Shepel N, Mayne M. Human herpesvirus type 6 indirectly enhances oligodendrocyte cell death. *J Neurovirol* 2003;9(5):539-50.
170. Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S, Yasukawa M. Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol* 2002;76(20):10338-45.



171. Ahlqvist J, Fotheringham J, Akhyani N, Yao K, Fogdell-Hahn A, Jacobson S. Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J Neurovirol* 2005;11(4):384-94.
172. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16):7440-4.
173. Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM. Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 2003;187(9):1365-76.
174. Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De las Heras V, Bartolome M, Arroyo R. Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Clin Virol* 2006;37 Suppl 1:S24-6.
175. Moore FG, Wolfson C. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002;106(2):63-83.
176. Voumvourakis KI, Kitsos DK, Tsiodras S, Petrikos G, Stamboulis E. Human herpesvirus 6 infection as a trigger of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 2010;85(11):1023-30.
177. Fotheringham J, Jacobson S. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: potential mechanisms for virus-induced disease. *Herpes* 2005;12(1):4-9.
178. Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003;53(2):189-97.
179. Luttichau HR, Clark-Lewis I, Jensen PO, Moser C, Gerstoft J, Schwartz TW. A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J Biol Chem* 2003;278(13):10928-33.
180. Soldan SS, Fogdell-Hahn A, Brennan MB, Mittleman BB, Ballerini C, Massacesi L, et al. Elevated serum and cerebrospinal fluid levels of soluble human herpesvirus type 6 cellular receptor, membrane cofactor protein, in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50(4):486-93.

181. Fogdell-Hahn A, Soldan SS, Shue S, Akhyani N, Refai H, Ahlqvist J, et al. Co-purification of soluble membrane cofactor protein (CD46) and human herpesvirus 6 variant A genome in serum from multiple sclerosis patients. *Virus Res* 2005;110(1-2):57-63.
182. Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Bartolome M, Arroyo R. CD46 expression and HHV-6 infection in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2009;120(4):246-50.
183. Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 2005;15(3):179-211.
184. Christensen T, Sorensen PD, Hansen HJ, Moller-Larsen A. Antibodies against a human endogenous retrovirus and the preponderance of env splice variants in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2003;9(1):6-15.
185. Christensen T, Jensen AW, Munch M, Haahr S, Sorensen PD, Riemann H, et al. Characterization of retroviruses from patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 1997;169:49-58.
186. Tai AK, Luka J, Ablashi D, Huber BT. HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. *J Clin Virol* 2009;46(1):47-8.
187. Colmegna I, Garry RF. Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2006;20(4):913-29.
188. Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, Sagara J, Guan X, Seki E, et al. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* 2004;9(11):1055-67.
189. Pullen LC, Park SH, Miller SD, Dal Canto MC, Kim BS. Treatment with bacterial LPS renders genetically resistant C57BL/6 mice susceptible to Theiler's virus-induced demyelinating disease. *J Immunol* 1995;155(9):4497-503.
190. Horvath Z, Vecsei L. [The significance of Chlamydia pneumoniae in selected neurologic disorders]. *Ideggyogy Sz* 2006;59(1-2):4-16.
191. Hammond CJ, Hallock LR, Howanski RJ, Appelt DM, Little CS, Balin BJ. Immunohistological detection of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's disease brain. *BMC Neurosci* 2010;11:121.

192. Sriram S, Mitchell W, Stratton C. Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* 1998;50(2):571-2.
193. Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, et al. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999;46(1):6-14.
194. Bagos PG, Nikolopoulos G, Ioannidis A. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler* 2006;12(4):397-411.
195. Munger KL, Peeling RW, Hernan MA, Chasan-Taber L, Olek MJ, Hankinson SE, et al. Infection with Chlamydia pneumoniae and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* 2003;14(2):141-7.
196. Fainardi E, Castellazzi M, Casetta I, Cultrera R, Vaghi L, Granieri E, et al. Intrathecal production of Chlamydia pneumoniae-specific high-affinity antibodies is significantly associated to a subset of multiple sclerosis patients with progressive forms. *J Neurol Sci* 2004;217(2):181-8.
197. Fainardi E, Castellazzi M, Tamborino C, Seraceni S, Tola MR, Granieri E, et al. Chlamydia pneumoniae-specific intrathecal oligoclonal antibody response is predominantly detected in a subset of multiple sclerosis patients with progressive forms. *J Neurovirol* 2009;15(5-6):425-33.
198. Stratton CW, Wheldon DB. Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving Chlamydia pneumoniae. *Trends Microbiol* 2006;14(11):474-9.
199. Rudick RA, Polman CH. Current approaches to the identification and management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2009;8(6):545-59.
200. Stone LA, Frank JA, Albert PS, Bash CN, Calabresi PA, Maloni H, et al. Characterization of MRI response to treatment with interferon beta-1b: contrast-enhancing MRI lesion frequency as a primary outcome measure. *Neurology* 1997;49(3):862-9.
201. Jongen PJ, Sindic C, Carton H, Zwanikken C, Lemmens W, Borm G. Improvement of health-related quality of life in relapsing remitting multiple sclerosis patients after 2 years of treatment with intramuscular interferon-beta-1a. *J Neurol* 2010;257(4):584-9.

202. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 1998;352(9139):1498-504.
203. IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 2001;57(12 Suppl 5):S3-9.
204. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39(3):285-94.
205. Rio J, Nos C, Tintore M, Borrás C, Galán I, Comabella M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 2002;52(4):400-6.
206. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000;405(6788):857-65.
207. Tribut O, Lessard Y, Reymann JM, Allain H, Bentue-Ferrer D. Pharmacogenomics. *Med Sci Monit* 2002;8(7):RA152-63.
208. Vandenbroeck K, Urcelay E, Comabella M. IFN-beta pharmacogenomics in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics* 2010;11(8):1137-48.
209. Goertsches RH, Zettl UK, Hecker M. Sieving treatment biomarkers from blood gene-expression profiles: a pharmacogenomic update on two types of multiple sclerosis therapy. *Pharmacogenomics* 2011;12(3):423-32.
210. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernandez O, Brassat D, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65(3):337-44.
211. Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suarez C, Rio J, Navarro A, Fernandez M, et al. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66(8):972-8.

212. O'Doherty C, Favorov A, Heggarty S, Graham C, Favorova O, Ochs M, et al. Genetic polymorphisms, their allele combinations and IFN-beta treatment response in Irish multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics* 2009;10(7):1177-86.
213. [http://www-ibmc.u-strasbg.fr/ict/immunomodulation/etude\\_des\\_mecanismes\\_eng.shtml](http://www-ibmc.u-strasbg.fr/ict/immunomodulation/etude_des_mecanismes_eng.shtml). .
214. Takeda K, Kaisho T, Akira S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:335-76.
215. Nunez C, Rueda B, Martinez A, Maluenda C, Polanco I, Lopez-Nevot MA, et al. A functional variant in the CD209 promoter is associated with DQ2-negative celiac disease in the Spanish population. *World J Gastroenterol* 2006;12(27):4397-400.
216. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002;3(7):667-72.
217. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000;105(4):497-504.
218. Akashi S, Nagai Y, Ogata H, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, et al. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 2001;13(12):1595-9.
219. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 2000;165(7):3541-4.
220. Buer J, Balling R. Mice, microbes and models of infection. *Nat Rev Genet* 2003;4(3):195-205.
221. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000;275(4):2251-4.
222. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000;164(2):558-61.
223. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth

- muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* 2001;89(3):244-50.
224. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167(5):2887-94.
225. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;195(1):99-111.
226. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of Toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* 2001;75(22):10730-37.
227. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(4):2281-6.
228. Lublin DM, Liszewski MK, Post TW, Arce MA, Le Beau MM, Rebentisch MB, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence for inclusion in the multigene family of complement-regulatory proteins. *J Exp Med* 1988;168(1):181-94.
229. Shusta EV, Zhu C, Boado RJ, Pardridge WM. Subtractive expression cloning reveals high expression of CD46 at the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61(7):597-604.
230. Cattaneo R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 2004;78(9):4385-8.
231. Cardone J, Le Friec G, Vantourout P, Roberts A, Fuchs A, Jackson I, et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat Immunol* 2010;11(9):862-71.
232. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115(1):1-20.

233. Rosche B, Cepok S, Stei S, Vogel F, Grummel V, Hoffmann S, et al. The role of the polio virus receptor and the herpesvirus entry mediator B genes for the development of MS. *J Neuroimmunol* 2004;156(1-2):171-7.
234. Tang H, Kawabata A, Takemoto M, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology* 2008;378(2):265-71.
235. Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 2003;77(8):4992-9.
236. Pasero C, Truneh A, Olive D. Cosignaling molecules around LIGHT-HVEM-BTLA: from immune activation to therapeutic targeting. *Curr Mol Med* 2009;9(7):911-27.
237. Shui JW, Steinberg MW, Kronenberg M. Regulation of inflammation, autoimmunity, and infection immunity by HVEM-BTLA signaling. *J Leukoc Biol* 2011;89(4):517-23.
238. Marsters SA, Ayres TM, Skubatch M, Gray CL, Rothe M, Ashkenazi A. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1997;272(22):14029-32.
239. Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(20):13733-6.
240. Migone TS, Zhang J, Luo X, Zhuang L, Chen C, Hu B, et al. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 2002;16(3):479-92.
241. Chang YC, Hsu TL, Lin HH, Chio CC, Chiu AW, Chen NJ, et al. Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3. *J Leukoc Biol* 2004;75(3):486-94.
242. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002;2(6):420-30.
243. Clark EA. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens* 1990;36(1):33-6.
244. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000;67(1):2-17.

245. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009;229(1):152-72.
246. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(1):4-43.
247. SAbiociences. CD40 Signaling. Qiagen.
248. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005;5(7):521-31.
249. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004;172(4):2225-31.
250. Larousserie F, Charlot P, Bardel E, Froger J, Kastelein RA, Devergne O. Differential effects of IL-27 on human B cell subsets. *J Immunol* 2006;176(10):5890-7.
251. Mellor AL, Munn DH. Physiologic control of the functional status of foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2011;186(8):4535-40.
252. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-26.
253. Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(14):5126-31.
254. Aikawa T, Whipple CA, Lopez ME, Gunn J, Young A, Lander AD, et al. Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells. *J Clin Invest* 2008;118(1):89-99.
255. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001;108(2):289-301.
256. Vitureira N, McNagny K, Soriano E, Burgaya F. Pattern of expression of the podocalyxin gene in the mouse brain during development. *Gene Expr Patterns* 2005;5(3):349-54.
257. Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(8):1669-76.



258. Dekan G, Gabel C, Farquhar MG. Sulfate contributes to the negative charge of podocalyxin, the major sialoglycoprotein of the glomerular filtration slits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(12):5398-402.
259. Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med* 1998;187(12):1965-75.
260. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13(3):227-31.
261. Duquette P, Murray TJ, Pleines J, Ebers GC, Sadovnick D, Weldon P, et al. Multiple sclerosis in childhood: clinical profile in 125 patients. *J Pediatr* 1987;111(3):359-63.
262. Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V, Sadovnick D. Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurology* 2002;59(7):1006-10.
263. Noseworthy J, Paty D, Wonnacott T, Feasby T, Ebers G. Multiple sclerosis after age 50. *Neurology* 1983;33(12):1537-44.
264. Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Comi G. Late onset multiple sclerosis: clinical characteristics, prognostic factors and differential diagnosis. *Neurol Sci* 2004;25 Suppl 4:S350-5.
265. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:16:1215.
266. Kimura A, Sasazuki T. Reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: HLA. Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference; 1991; Oxford. Oxford University Press.
267. Tremmel M, Opelz G, Mytilineos J. High-resolution typing for HLA-DRB1\*15 and -DRB1\*16 by fluorescence-marked sequence-specific priming (TaqMan assay). *Tissue Antigens* 1999;54:508-16.
268. Hymas W, Stevenson J, Taggart EW, Hillyard D. Use of lyophilized standards for the calibration of a newly developed real time PCR assay for human herpes type six (HHV6) variants A and B. *J Virol Methods* 2005;128(1-2):143-50.

269. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444-52.
270. Qin ZS, Niu T, Liu JS. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002;71(5):1242-7.
271. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263-5.
272. Wigginton JE, Abecasis GR. PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* 2005;21(16):3445-7.
273. Zhao JH. 2LD, GENECOUNTING and HAP: Computer programs for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics* 2004;20(8):1325-6.
274. Stram DO. Software for tag single nucleotide polymorphism selection. *Hum Genomics* 2005;2(2):144-51.
275. Editorial. Genetic Analysis of Multiple Sclerosis in Europeans. *J Neuroimmunol* 2003;143:1-6.
276. Sawcer S, Compston A. The genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans: concepts and design. *J Neuroimmunol* 2003;143(1-2):13-6.
277. Bach JF. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:74-80. Epub 2005 Nov 10.
278. Steiner I, Nisipianu P, Wirguin I. Infection and the etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci* 2001;Rep. 1:271-76.
279. Oksenberg JR, Barcellos LF. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes Immun* 2005;6:375-87.
280. Granieri E, Casetta I, Tola MR, Ferrante P. Multiple sclerosis: the infectious hypothesis. *Neurol. Sci.* 2001;22:179-85.
281. Kenealya SJ, Pericak-Vanceb MA, Haines JL. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;143:7-12.
282. Miranda-Hernandez S, Gerlach N, Fletcher JM, Biros E, Mack M, Korner H, et al. Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2011;187(2):791-804.

283. Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int Immunol* 2002;14(7):695-700.
284. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 2001;276:2551–54.
285. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):599-603.
286. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603-06.
287. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin/IgG complexes activate autoreactive B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002;416(6881):603-07.
288. Zanin-Zhorov A, Tal-Lapidot G, Cahalon L, Cohen-Sfady M, Pevsner-Fischer M, Lider O, et al. Cutting edge: T cells respond to lipopolysaccharide innately via TLR4 signaling. *J Immunol.* 2007;179(1):41-44.
289. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61(11):1013-21.
290. Reindl M, Lutterotti A, Ingram J, Schanda K, Gassner C, Deisenhammer F, et al. Mutations in the gene for toll-like receptor 4 and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2003;61(1)(85-88).
291. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009;18(4):767-78.
292. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347(3):185-92.
293. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a

- mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol*. 2004;112(1):85-91.
294. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis*. 2002;186(10):1522-25.
295. Liao WL, Chen RH, Lin HJ, Liu YH, Chen WC, Tsai Y, et al. Toll-like receptor gene polymorphisms are associated with susceptibility to Graves' ophthalmopathy in Taiwan males. *BMC Med Genet* 2010;11:154.
296. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Beares I, Munoz Cacho P, Mata C, Calvo-Alen J, et al. Lack of association between Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50(9):1562-8.
297. Wang LZ, Yu JT, Miao D, Wu ZC, Zong Y, Wen CQ, et al. Genetic association of TLR4/11367 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in a Han Chinese population. *Brain Res* 2011;1381:202-7.
298. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology* 2009;150(8):3877-84.
299. Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006;116(12):3252-7.
300. Cuida M, Legler DW, Eidsheim M, Jonsson R. Complement regulatory proteins in the salivary glands and saliva of Sjogren's syndrome patients and healthy subjects. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(6):615-23.
301. Kawano M, Seya T, Koni I, Mabuchi H. Elevated serum levels of soluble membrane cofactor protein (CD46, MCP) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):542-6.
302. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999;99(7):817-27.
303. Assem MM, Gad WH, El-Sharkawy NM, El-Rouby MN, Ghaleb FM, Tarek H, et al. Prevalence of anti human herpes virus-6 IgG and its receptor in acute leukemia (membrane cofactor protein: MCP, CD46). *J Egypt Natl Canc Inst* 2005;17(1):29-34.

304. Astier AL. T-cell regulation by CD46 and its relevance in multiple sclerosis. *Immunology* 2008;124(2):149-54.
305. Ni Choileain S, Astier AL. CD46 plasticity and its inflammatory bias in multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011;59(1):49-59.
306. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D, et al. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;180(1-2):178-84.
307. Yao K, Graham J, Akahata Y, Oh U, Jacobson S. Mechanism of neuroinflammation: enhanced cytotoxicity and IL-17 production via CD46 binding. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5(3):469-78.
308. Shahbazi M, Ebadi H, Fathi D, Roshandel D, Mohamadhosseni M, Tahmasebi A, et al. HLA-DRB1\*1501 intensifies the impact of IL-6 promoter polymorphism on the susceptibility to multiple sclerosis in an Iranian population. *Mult Scler* 2010;16(10):1173-7.
309. Shahbazi M, Roshandel D, Ebadi H, Fathi D, Zamani M, Boghaee M, et al. High frequency of the IL-2 -330 T/HLA-DRB1\*1501 haplotype in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2010;137(1):134-8.
310. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PM, Imielinski M, Guthery SL, et al. Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2008;40(10):1211-5.
311. Levine A, Kugathasan S, Annese V, Biank V, Leshinsky-Silver E, Davidovich O, et al. Pediatric onset Crohn's colitis is characterized by genotype-dependent age-related susceptibility. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(12):1509-15.
312. Meinzer U, Idestrom M, Alberti C, Peuchmaur M, Belarbi N, Bellaiche M, et al. Ileal involvement is age dependent in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(7):639-44.
313. Sauer CG, Kugathasan S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. *Gastroenterol Clin North Am* 2009;38(4):611-28.

314. Schmidt S, Pericak-Vance MA, Sawcer S, Barcellos LF, Hart J, Sims J, et al. Allelic association of sequence variants in the herpes virus entry mediator-B gene (PVRL2) with the severity of multiple sclerosis. *Genes Immun* 2006;7(5):384-92.
315. Christensen T. Human herpesviruses in MS. *Int MS J* 2007;14(2):41-7.
316. Knox KK, Brewer JH, Henry JM, Harrington DJ, Carrigan DR. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: systemic active infections in patients with early disease. *Clin Infect Dis* 2000;31(4):894-903.
317. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997;3(12):1394-7.
318. Kang YM, Kim SY, Kang JH, Han SW, Nam EJ, Kyung HS, et al. LIGHT up-regulated on B lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis mediates cellular adhesion and metalloproteinase production by synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1106-17.
319. Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, et al. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology* 2009;128(1 Suppl):e315-24.
320. Pierer M, Brentano F, Rethage J, Wagner U, Hantzschel H, Gay RE, et al. The TNF superfamily member LIGHT contributes to survival and activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(7):1063-70.
321. Granger SW, Rickert S. LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(3-4):289-96.
322. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burtt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2008;40(10):1216-23.
323. Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet* 2008;40(10):1156-9.
324. Blanco-Kelly F, Alvarez-Lafuente R, Alcina A, Abad-Grau MM, de Las Heras V, Lucas M, et al. Members 6B and 14 of the TNF receptor superfamily in multiple sclerosis predisposition. *Genes Immun* 2011;12(2):145-8.

325. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476(7359):214-9.
326. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447(7145):661-78.
327. van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW. Genetic variants in the prediction of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(9):1694-6.
328. Kawasaki M, Sekigawa I, Nozawa K, Kaneko H, Takasaki Y, Takamori K, et al. Changes in the gene expression of peripheral blood mononuclear cells during the menstrual cycle of females is associated with a gender bias in the incidence of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(2):260-6.
329. Amre DK, Mack DR, Morgan K, Fujiwara M, Israel D, Deslandres C, et al. Investigation of reported associations between the 20q13 and 21q22 loci and pediatric-onset Crohn's disease in Canadian children. *Am J Gastroenterol* 2009;104(11):2824-8.
330. Fayad R, Brand MI, Stone D, Keshavarzian A, Qiao L. Apoptosis resistance in ulcerative colitis: high expression of decoy receptors by lamina propria T cells. *Eur J Immunol* 2006;36(8):2215-22.
331. Kim S, Fotiadu A, Kotoula V. Increased expression of soluble decoy receptor 3 in acutely inflamed intestinal epithelia. *Clin Immunol* 2005;115(3):286-94.
332. Perdignes N, Vigo AG, Lamas JR, Martinez A, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al. Evidence of epistasis between TNFRSF14 and TNFRSF6B polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62(3):705-10.
333. Ruemmele FM. Pediatric inflammatory bowel diseases: coming of age. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26(4):332-6.
334. Chen SJ, Wang YL, Kao JH, Wu SF, Lo WT, Wu CC, et al. Decoy receptor 3 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by directly counteracting local inflammation and downregulating Th17 cells. *Mol Immunol* 2009;47(2-3):567-74.
335. Mueller AM, Pedre X, Killian S, David M, Steinbrecher A. The Decoy Receptor 3 (DcR3, TNFRSF6B) suppresses Th17 immune responses and is abundant in human cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 2009;209(1-2):57-64.

336. Zhang Y, Xu G, Zhang L, Roberts AI, Shi Y. Th17 cells undergo Fas-mediated activation-induced cell death independent of IFN-gamma. *J Immunol* 2008;181(1):190-6.
337. Funke B, Autschbach F, Kim S, Lasitschka F, Strauch U, Rogler G, et al. Functional characterisation of decoy receptor 3 in Crohn's disease. *Gut* 2009;58(4):483-91.
338. Hsu TL, Chang YC, Chen SJ, Liu YJ, Chiu AW, Chio CC, et al. Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3. *J Immunol* 2002;168(10):4846-53.
339. Alarcon-Segovia D. Shared autoimmunity: a concept for which the time has come. *Autoimmunity* 2005;38(3):201-3.
340. Anaya JM, Gomez L, Castiblanco J. Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clin Dev Immunol* 2006;13(2-4):185-95.
341. Neuhausen SL, Steele L, Ryan S, Mousavi M, Pinto M, Osann KE, et al. Co-occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiacs and their first-degree relatives. *J Autoimmun* 2008;31(2):160-5.
342. Heap GA, van Heel DA. The genetics of chronic inflammatory diseases. *Hum Mol Genet* 2009;18(R1):R101-6.
343. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007;357(10):977-86.
344. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* 2008;359(26):2767-77.
345. Cheung TC, Coppieters K, Sanjo H, Osborne LM, Norris PS, Coddington A, et al. Polymorphic variants of LIGHT (TNF superfamily-14) alter receptor avidity and bioavailability. *J Immunol* 2010;185(3):1949-58.
346. Murphy KM, Nelson CA, Sedy JR. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol* 2006;6(9):671-81.
347. Johnson BA, Wang J, Taylor EM, Caillier SJ, Herbert J, Khan OA, et al. Multiple sclerosis susceptibility alleles in African Americans. *Genes Immun* 2010;11(4):343-50.



348. Fiorino G, Rovida S, Correale C, Malesci A, Danese S. Emerging biologics in the treatment of inflammatory bowel disease: what is around the corner? *Curr Drug Targets* 2010;11(2):249-60.
349. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 1987;196(4):947-50.
350. Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology* 2005;146(6):2684-91.
351. Gandhi KS, McKay FC, Cox M, Riveros C, Armstrong N, Heard RN, et al. The multiple sclerosis whole blood mRNA transcriptome and genetic associations indicate dysregulation of specific T cell pathways in pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2010;19(11):2134-43.
352. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M. Association of a C/T single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene with Graves' disease in Japanese. *Thyroid* 2006;16(5):443-6.
353. Kurylowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A, Jurecka-Lubieniecka B, Zebracka J, et al. Association of CD40 gene polymorphism (C-1T) with susceptibility and phenotype of Graves' disease. *Thyroid* 2005;15(10):1119-24.
354. Wang CR, Liu MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003;132(2):371-8.
355. Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* 1993;261(5126):1328-30.
356. Chen CR, Aliesky HA, Guo J, Rapoport B, McLachlan SM. Blockade of costimulation between T cells and antigen-presenting cells: an approach to suppress murine Graves' disease induced using thyrotropin receptor-expressing adenovirus. *Thyroid* 2006;16(5):427-34.

357. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, et al. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(6):2499-504.
358. Battaglia E, Biancone L, Resegotti A, Emanuelli G, Fronda GR, Camussi G. Expression of CD40 and its ligand, CD40L, in intestinal lesions of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94(11):3279-84.
359. Chadha S, Miller K, Farwell L, Lightstone LB, Daly MJ, Rioux JD, et al. Haplotype structure of TNFRSF5-TNFSF5 (CD40-CD40L) and association analysis in systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2005;13(5):669-76.
360. Cooper JD, Smyth DJ, Bailey R, Payne F, Downes K, Godfrey LM, et al. The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet* 2007;8:71.
361. Ait-Ghezala G, Mathura VS, Laporte V, Quadros A, Paris D, Patel N, et al. Genomic regulation after CD40 stimulation in microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;140(1-2):73-85.
362. Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ, Kopf M. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(3):876-81.
363. t Hart BA, Hintzen RQ, Laman JD. Preclinical assessment of therapeutic antibodies against human CD40 and human interleukin-12/23p40 in a nonhuman primate model of multiple sclerosis. *Neurodegener Dis* 2008;5(1):38-52.
364. t Hart BA, Blezer EL, Brok HP, Boon L, de Boer M, Bauer J, et al. Treatment with chimeric anti-human CD40 antibody suppresses MRI-detectable inflammation and enlargement of pre-existing brain lesions in common marmosets affected by MOG-induced EAE. *J Neuroimmunol* 2005;163(1-2):31-9.
365. Laman JD, t Hart BA, Brok H, Meurs M, Schellekens MM, Kasran A, et al. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* 2002;32(8):2218-28.

366. Buck D, Kroner A, Rieckmann P, Maurer M, Wiendl H. Analysis of the C/T(-1) single nucleotide polymorphism in the CD40 gene in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2006;68(4):335-8.
367. Plant D, Flynn E, Mbarek H, Dieude P, Cornelis F, Arlestig L, et al. Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers. *Ann Rheum Dis* 2010;69(8):1548-53.
368. Wang K, Baldassano R, Zhang H, Qu HQ, Imielinski M, Kugathasan S, et al. Comparative genetic analysis of inflammatory bowel disease and type 1 diabetes implicates multiple loci with opposite effects. *Hum Mol Genet* 2010;19(10):2059-67.
369. Urshansky N, Mausner-Fainberg K, Auriel E, Regev K, Farhum F, Karni A. Dysregulated neurotrophin mRNA production by immune cells of patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2010;295(1-2):31-7.
370. Jensen CJ, Stankovich J, Van der Walt A, Bahlo M, Taylor BV, van der Mei IA, et al. Multiple sclerosis susceptibility-associated SNPs do not influence disease severity measures in a cohort of Australian MS patients. *PLoS One* 2010;5(4):e10003.
371. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 2009;182(9):5748-56.
372. Guo B, Chang EY, Cheng G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* 2008;118(5):1680-90.
373. Goldberg R, Zohar Y, Wildbaum G, Geron Y, Maor G, Karin N. Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* 2004;173(10):6465-71.
374. Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, et al. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67(10):1474-9.
375. Cao Y, Doodes PD, Glant TT, Finnegan A. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J Immunol* 2008;180(2):922-30.
376. Baker BJ, Park KW, Qin H, Ma X, Benveniste EN. IL-27 inhibits OSM-mediated TNF-alpha and iNOS gene expression in microglia. *Glia* 2010;58(9):1082-93.

377. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2009;41(6):703-7.
378. Reddy MP, Wang H, Liu S, Bode B, Reed JC, Steed RD, et al. Association between type 1 diabetes and GWAS SNPs in the southeast US Caucasian population. *Genes Immun* 2011.
379. Cox JH, Kljavin NM, Ramamoorthi N, Diehl L, Batten M, Ghilardi N. IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms. *J Exp Med* 2011;208(1):115-23.
380. Li CS, Zhang Q, Lee KJ, Cho SW, Lee KM, Hahm KB, et al. Interleukin-27 polymorphisms are associated with inflammatory bowel diseases in a Korean population. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(10):1692-6.
381. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 2007;445(7130):931-5.
382. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8(5):457-62.
383. Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, et al. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 2009;323(5920):1488-92.
384. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(14):5138-43.
385. Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(18):6449-54.
386. Reikvam DH, Perminow G, Lyckander LG, Gran JM, Brandtzaeg P, Vatn M, et al. Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 2011.

387. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology* 2008;125(2):178-83.
388. Martin-Saavedra FM, Gonzalez-Garcia C, Bravo B, Ballester S. Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4+ cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. *Mol Immunol* 2008;45(15):4008-19.
389. Awasthi A, Murugaiyan G, Kuchroo VK. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *J Clin Immunol* 2008;28(6):660-70.
390. Lina C, Conghua W, Nan L, Ping Z. Combined Treatment of Etanercept and MTX Reverses Th1/Th2, Th17/Treg Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Immunol* 2011.
391. Toulza F, Nosaka K, Tanaka Y, Schioppa T, Balkwill F, Taylor GP, et al. Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2010;185(1):183-9.
392. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Decreased mRNA expression of two FOXP3 isoforms in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24(1):7-14.
393. Grant J, Bourcier K, Wallace S, Pan D, Conway A, Seyfert-Margolis V, et al. Validated protocol for FoxP3 reveals increased expression in type 1 diabetes patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76(2):69-78.
394. Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev* 2010;233(1):97-111.
395. Ban H, Andoh A, Shioya M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Increased number of FoxP3+CD4+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Mol Med Report* 2008;1(5):647-50.
396. Karlsson F, Robinson-Jackson SA, Gray L, Zhang S, Grisham MB. Ex vivo generation of regulatory T cells: characterization and therapeutic evaluation in a model of chronic colitis. *Methods Mol Biol* 2011;677:47-61.

397. Shen Z, Chen L, Hao F, Wang G, Liu Y. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J Cell Mol Med* 2010;14(1-2):226-41.
398. Lan Y, Tang XS, Qin J, Wu J, Qin JM. [Association of transcription factor FOXP3 gene polymorphism with genetic susceptibility to systematic lupus erythematosus in Guangxi Zhuang population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2010;27(4):433-6.
399. Owen CJ, Eden JA, Jennings CE, Wilson V, Cheetham TD, Pearce SH. Genetic association studies of the FOXP3 gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population. *J Mol Endocrinol* 2006;37(1):97-104.
400. Park O, Grishina I, Leung PS, Gershwin ME, Prindiville T. Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:218-28.
401. Eastell T, Hinks A, Thomson W. SNPs in the FOXP3 gene region show no association with Juvenile Idiopathic Arthritis in a UK Caucasian population. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(8):1263-5.
402. Howson JM, Walker NM, Smyth DJ, Todd JA. Analysis of 19 genes for association with type I diabetes in the Type I Diabetes Genetics Consortium families. *Genes Immun* 2009;10 Suppl 1:S74-84.
403. Iwase K, Shimada A, Kawai T, Okubo Y, Kanazawa Y, Irie J, et al. FOXP3/Scurfin gene polymorphism is associated with adult onset type 1 diabetes in Japanese, especially in women and slowly progressive-type patients. *Autoimmunity* 2009;42(2):159-67.
404. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(17):9979-84.
405. John S, Shephard N, Liu G, Zeggini E, Cao M, Chen W, et al. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. *Am J Hum Genet* 2004;75(1):54-64.
406. Thompson SD, Moroldo MB, Guyer L, Ryan M, Tombragel EM, Shear ES, et al. A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis Rheum* 2004;50(9):2920-30.

407. Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(18):10746-50.
408. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003;34(4):395-402.
409. Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum* 2004;50(4):1117-21.
410. Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F, et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis* 2005;64(4):587-93.
411. Martinez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, Lamas JR, Fernandez-Arquero M, Balsa A, et al. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(10):1263-6.
412. Qureshi IA, Mehler MF. Genetic and epigenetic underpinnings of sex differences in the brain and in neurological and psychiatric disease susceptibility. *Prog Brain Res* 2010;186:77-95.
413. Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Immunol* 2010;185(8):4948-58.
414. Morales-Tirado V, Wichlan DG, Leimig TE, Street SE, Kasow KA, Riberdy JM. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) catalyzes suppressive activity on human natural regulatory T cells, uniquely modulates cell cycle progression, and augments FOXP3. *Clin Immunol* 2011;138(2):212-21.
415. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996;13(4):472-6.
416. Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, Esposito L, Merriman ME, Wilson AJ, et al. A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. *Nat Genet* 1998;19(3):301-2.

417. Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol* 2008;9(5):224.
418. Jackson SM, Nakato H, Sugiura M, Jannuzi A, Oakes R, Kaluza V, et al. dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. *Development* 1997;124(20):4113-20.
419. Cenit MD, Blanco-Kelly F, de las Heras V, Bartolome M, de la Concha EG, Urcelay E, et al. Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study. *Mult Scler* 2009;15(8):913-7.
420. Luxardi G, Galli A, Forlani S, Lawson K, Maina F, Dono R. Glypicans are differentially expressed during patterning and neurogenesis of early mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352(1):55-60.
421. Van Vactor D, Wall DP, Johnson KG. Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16(1):40-51.
422. van Horssen J, Bo L, Dijkstra CD, de Vries HE. Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. *Neurobiol Dis* 2006;24(3):484-91.
423. Lorentzen AR, Melum E, Ellinghaus E, Smestad C, Mero IL, Aarseth JH, et al. Association to the Glypican-5 gene in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;226(1-2):194-7.
424. Cavanillas ML, Fernandez O, Comabella M, Alcina A, Fedetz M, Izquierdo G, et al. Replication of top markers of a genome-wide association study in multiple sclerosis in Spain. *Genes Immun* 2011;12(2):110-5.
425. Vitureira N, Andres R, Perez-Martinez E, Martinez A, Bribian A, Blasi J, et al. Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PLoS One* 2010;5(8):e12003.
426. Agarwal N, Lippmann ES, Shusta EV. Identification and expression profiling of blood-brain barrier membrane proteins. *J Neurochem* 2010;112(3):625-35.
427. Nowakowski A, Alonso-Martin S, Gonzalez-Manchon C, Larrucea S, Fernandez D, Vilar M, et al. Ventricular enlargement associated with the panneural ablation of the podocalyxin gene. *Mol Cell Neurosci* 2010;43(1):90-7.
428. Hayatsu N, Kaneko MK, Mishima K, Nishikawa R, Matsutani M, Price JE, et al. Podocalyxin expression in malignant astrocytic tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374(2):394-8.



429. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 2008;9(2):137-45.
430. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* 2008;131(Pt 3):785-99.
431. Dawn Teare M BJ. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005;366(9490):1036-44.
432. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 2001;250(3):186-200.
433. Rio J, Comabella M, Montalban X. Multiple sclerosis: current treatment algorithms. *Curr Opin Neurol* 2011;24(3):230-7.
434. Macchiardi F, Boneschi FM, Cohen D. Pharmacogenetics of autoimmune diseases: research issues in the case of Multiple Sclerosis and the role of IFN-beta. *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:1-5.
435. Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol* 2007;178(11):6705-9.
436. Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 2004;40(12):861-8.
437. Barton GM, Medzhitov R. Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression. *Nat Immunol* 2003;4(5):432-3.
438. Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007;191(1-2):70-8.
439. Marckmann S, Wiesemann E, Hilse R, Trebst C, Stangel M, Windhagen A. Interferon-beta up-regulates the expression of co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 on monocytes: significance for treatment of multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004;138(3):499-506.
440. Liu Z, Pelfrey CM, Cotleur A, Lee JC, Rudick RA. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;112(1-2):153-62.

441. Wieseemann E, Sonmez D, Heidenreich F, Windhagen A. Interferon-beta increases the stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells to induce IL-13, IL-5 and IL-10 in autologous T-cells. *J Neuroimmunol* 2002;123(1-2):160-9.
442. Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 2001;186(3):448-56.
443. Leppert D, Waubant E, Burk MR, Oksenberg JR, Hauser SL. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;40(6):846-52.
444. Stuve O, Dooley NP, Uhm JH, Antel JP, Francis GS, Williams G, et al. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996;40(6):853-63.
445. Conrady CD, Jones H, Zheng M, Carr DJ. A Functional Type I Interferon Pathway Drives Resistance to Cornea Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Recruitment of Leukocytes. *J Biomed Res* 2011;25(2):111-19.
446. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3(+) regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med* 2011;17(6):673-5.
447. Casey G, Neville PJ, Liu X, Plummer SJ, Cicek MS, Krumroy LM, et al. Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. *Hum Mol Genet* 2006;15(5):735-41.
448. Liu C, Li Wan Po A, Blumhardt LD. "Summary measure" statistic for assessing the outcome of treatment trials in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64(6):726-9.







# Índice de abreviaturas

Ac: Anticuerpos.

APC: Células Presentadoras de Antígenos.

AR / -RA-: Artritis Reumatoide / Rheumathoid Arthritis.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

BTLA: Immunoglobuline superfamily members B and T lymphocyte attenuator.

Cd: Células Dendríticas.

CD: Cluster de diferenciación.

CeD: Celiaquía.

COP-1: Copolimero 1.

CP: Célula Plasmática.

Cr: Cromosoma

CT: Citotoxico

DcR3: Decoy Receptor 3.

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin.

Dlg1: Drosophila disc large tumor suppressor.

DL: Desequilibrio de Ligamiento.

DM1 / T1D: Diabetes tipo 1 / Type 1 Diabetes.

DTHL: asparragina -D-, treonina -T-, histidina -H- y leucina -L-.

EAE: Encefalopatía Autoinmune Experimental.

EBI3: Gen 3 inducido por el virus Eipstein-Barr.

EBNA1: Anticuerpos anti-EBV.

EBV: Virus Epstein-Barr.

EC / -CD-: Enfermedad de Crohn / -Crohn's Disease-.

EM / -MS-: Esclerosis Múltiple / Multiple Sclerosis.

Escala EDSS: Expanded Disability Status Scale.

Foxp3: Forkhead Box P3

GC: centro germinal.

gD: envuelta glicoproteica D.

GPC5: Glypican 5

GWAS: Genome Wide Association Studies.

HCSC: Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

HERV: Retrovirus Endógenos Humanos.

HHV6: Herpes Virus Humano 6.

HLA: Antígeno de Histocompatibilidad Humano

HVEA: Herpesvirus Entry Mediator A.

HVEB: Herpes Virus Entry Mediator B.

HVEM: Herpesvirus Entry Mediator.

Hsps: Proteínas de Shock Térmico.

HTLV-1: Virus humano linfotrófico T.

HVS1: Virus Herpes Simple tipo 1.

IFN $\beta$ : Interferón Beta.

IL27: Interleuquina 27.

IL30: Interleuquina 30

IMSGC : International Multiple Sclerosis Genetics Consortium.

ISRE: Elemento de Estimulación de Respuesta por Interferón $\gamma$ .

LB: Linfocitos B.

LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein (Proteína de Unión a Lipopolisacárido).

LCL: Línea Celular Linfoblastoide.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

LG: Ligando.

LIGHT: Ligand for Herpesvirus Entry Mediator.

LPS: Lipopolisacárido bacteriano.

LRRs: Repeticiones Ricas en Leucina.

LT: Linfocitos T.

MCP: Membrane Cofactor Protein.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MOG: Glicoproteína de Mielina Específica de Oligodendrocitos.

MOMP: Proteína Mayor de la Membrana Externa.

MyD88: proteína de diferenciación mieloide de respuesta primaria 88.

OR: Odds Ratio.

PBM: Proteína Básica de Mielina.

PC: Podocalyxin.

PCLP: Podocalyxin-Like Protein.

PCR-SSOP: Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligonucleotid Probe

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PEV: Potenciales Evocados

PODXL: Podocalyxin-Like.

PP: Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva.

PR: Esclerosis Múltiple Progresiva Recurrente.

PRRs: Receptores Reconocedores de Patrones.

PSD95: post synaptic density protein.

RM: Resonancia Magnética.

RI: Respuesta Inmune.

RR: Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente.

SCR: Short Consensus Repeat.

SI: Sistema Inmune.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva.

TE: buffer Tris-EDTA.

TIR: receptor Toll/interleuquina 1.

Th: Linfocitos T helper.

TLR: Toll like receptor.

TLR4: Toll like receptor 4

TMEV: Encefalomielopatía múrida vírica de Theiler.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.



TNFRSF: Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral.

TNFRSF5: Miembro 5 de la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral.

TNFRSF6B: Miembro 6B de la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral.

TNFRSF14: Miembro 14 de la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral.

TRAF: Factor Asociado a Receptor de TNF.

Treg: Linfocitos T reguladores.

Zo-1: zonula occludens-1.

WGS: whole genome scan.

WSX1/TCRR: receptor de citoquinas clase I.

$\Delta R_n$ : logaritmo de la señal normalizado en base a una referencia interna.

$\lambda$ : proporción de riesgo de recurrencia.





# Índice de figuras

<b>Fig. 1.</b> RM T2 cerebral en paciente de 51 años con EM. ....	21
<b>Fig. 2.</b> Hipótesis sobre la Respuesta Inmune (RI) en las lesiones agudas de la Esclerosis Múltiple (EM). ....	28
<b>Fig. 3.</b> Prevalencia mundial de la EM por cada 100.000 habitantes <sup>105</sup> . ....	30
<b>Fig. 4.</b> Solapamiento entre loci de riesgo genético para enfermedades autoinmunes.....	32
<b>Fig. 5.</b> Genes HLA. ....	33
<b>Fig. 6.</b> Expansión LB inducida por Virus Epstein-Barr (EBV) y vulnerabilidad del SI <sup>159</sup> .....	38
<b>Fig.7.</b> Rutas de señalización de IFN $\beta$ . ....	43
<b>Fig. 8.</b> Posición del gen del <i>TLR4</i> dentro del cromosoma 9. (NCBI). ....	44
<b>Fig.9.</b> Receptores Toll. ....	45
<b>Fig. 10.</b> Rutas de señalización del TLR4. ....	46
<b>Fig. 11.</b> Posición del gen del <i>CD46</i> dentro del cromosoma 1. (NCBI). ....	47
<b>Fig. 12.</b> Estructura de CD46. ....	47
<b>Fig. 13.</b> Superfamilia de los Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF) y sus ligandos. ....	48
<b>Fig. 14.</b> Posición del gen del <i>TNFRSF14</i> dentro del cromosoma 1. (NCBI). ....	48
<b>Fig. 15.</b> Estructura de TNFRSF14. ....	49
<b>Fig. 16.</b> Posición del gen del <i>TNFRSF6B</i> dentro del cromosoma 20. (NCBI). ....	50
<b>Fig. 17.</b> Rutas apoptóticas de <i>Dcr3</i> ( <i>Decoy Receptor 3</i> ). (Señaladas en rojo) <sup>242</sup> . ....	50
<b>Fig. 18.</b> Posición del gen del <i>TNFRSF5 / CD40</i> dentro del cromosoma 20. (NCBI). ....	51
<b>Fig. 19.</b> Rutas de señalización de CD40 unido a su ligando (CD40L) <sup>247</sup> . ....	51
<b>Fig. 20.</b> Posición del gen de <i>la IL27</i> dentro del cromosoma 16. (NCBI). ....	52
<b>Fig. 21.</b> Estructura de IL-27 (Interleuquina 27). ....	52
<b>Fig. 22.</b> Posición del gen de <i>Foxp3</i> dentro del cromosoma X. (NCBI). ....	53
<b>Fig. 23.</b> Estructura proteica y génica de Foxp3 <sup>252</sup> .....	53
<b>Fig. 24.</b> Posición del gen de <i>GPC5</i> dentro del cromosoma 13. (NCBI). ....	54

<b>Fig. 25.</b> Estructura proteica de los glipicanos (imagen modificada) <sup>254</sup> .....	54
<b>Fig. 26.</b> Posición del gen de la <i>PODXL</i> dentro del cromosoma 7. (NCBI). ....	55
<b>Fig. 27.</b> Estructura de Podocalicina. ....	55
<b>Fig. 28.</b> Tecnología Taqman®. Applied Biosystems®. ....	72
<b>Fig. 29.</b> Cálculo del DL para <i>TLR4</i> en población control. ....	89
<b>Fig. 30.</b> Cálculo del desequilibrio de ligamiento para <i>CD46</i> en población control. ....	100
<b>Fig. 31.</b> Relación de los ligandos de HVEM y DcR3.....	115
<b>Fig. 32.</b> Cálculo de DL entre los 3 SNPs analizados de <i>Foxp3</i> en mujeres control. ....	132
<b>Fig. 33.</b> Cálculo del DL de los 3 SNPs de <i>Foxp3</i> con el microsatélite de <i>Foxp3</i> en mujeres control.....	132
<b>Fig. 34.</b> Posición genómica de los rs9523554, rs9523762 y rs9523787 del gen <i>GPC5</i> . ....	137





# Publicaciones

## A. Artículos

### Revista internacionales

AUTORES (p.o. de firma): Blanco-Kelly F, Alvarez-Lafuente R, Alcina A, Abad-Grau MM, de Las Heras V, Lucas M, de la Concha EG, Fernández O, Arroyo R, Matesanz F, Urcelay E.

TÍTULO: Members 6B and 14 of the TNF receptor superfamily in multiple sclerosis predisposition.

REF. Genes Immun. 2011 Mar;12(2):145-8. Epub 2010 Oct 21.

AUTORES (p.o. de firma): Alvarez-Lafuente R, Blanco-Kelly F, Garcia-Montojo M, Martínez A, Heras Vde L, Dominguez-Mozo MI, Bartolome M, Garcia-Martinez A, Concha EG, Urcelay E, Arroyo R.

TÍTULO: CD46 in a Spanish cohort of multiple sclerosis patients: genetics, mRNA expression and response to interferon-beta treatment.

REF. Mult Scler. 2011 May;17(5):513-20. Epub 2010 Dec 21

AUTORES (p.o. de firma): Blanco-Kelly F, Matesanz F, Alcina A, Teruel M, Díaz-Gallo LM, Gómez-García M, López-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A, Cardeña C, Alcain G, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, Fernandez O, Arroyo R, Martín J, Urcelay E.

TÍTULO: CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility.

REF.: PLoS One. 2010 Jul 12;5(7):e11520.



AUTORES (p.o. de firma): Cénit MD, Blanco-Kelly F, de las Heras V, Bartolomé M, de la Concha EG, Urcelay E, Arroyo R, Martínez A.

TÍTULO: Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study.

REF.: Mult Scler. 2009 Aug;15(8):913-7. Epub 2009 Jun 25.

AUTORES (p.o. de firma): Urcelay E, Blanco-Kelly F, de Las Heras V, de la Concha EG, Arroyo R, Martínez A.

TÍTULO: TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population.

REF.: J Neuroimmunol. 2007 Dec;192(1-2):215-8. Epub 2007 Oct 29.

## **B. Posters**

### **Congresos internacionales**

25<sup>th</sup> Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis.  
Dusseldorf, Alemania, 9-12 de septiembre 2009.

CD46 expression and HHV-6 infection in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta.  
A one-year follow-up study

M. Garcia-Montojo, F. Blanco-Kelly, M.I. Dominguez-Mozo, A. Martinez, V. De Las Heras, M. Lopez-Cavanillas, A. Garcia-Martinez, E.G. de la Concha, M. Bartolome, E. Urcelay, R. Arroyo, R. Alvarez-Lafuente.

24<sup>th</sup> Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis.  
Montreal ,Canada, 17-20 de septiembre 2008.

“TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case control study in the Spanish population”.

F. Blanco-Kelly, F. Bartolome, E. Urcelay, V. De las Heras, R. Arroyo, R. Alvarez-Lafuente, E. De la Concha, A. Martinez.

23<sup>rd</sup> Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis.  
Praga, Republica Checa 11-14 octubre 2007.

“Genetic analysis of CD46, the HHV6-receptor, in Spanish multiple sclerosis patients and controls”.

R. Alvarez-Lafuente, F. Blanco-Kelly, A. Martinez, A. Mas-Fontao, V. De las Heras, M. Garcia-Montojo, E. De la Concha, M. Bartolome, E. Urcelay, R. Arroyo.

## **Congresos nacionales**

LXI Reunión anual de la Sociedad Española de Neurología. Barcelona, 17-21 de noviembre, 2009.

“CD40: asociación a Esclerosis Múltiple y respuesta al tratamiento con interferón beta”

V. de las Heras, F. Blanco-Kelly, M. Bartolome, E. De la Concha, R. Alvarez-Lafuente, E. Urcelay, A. Rafael

LXI Reunión anual de la Sociedad Española de Neurología. Barcelona, 17-21 de noviembre, 2009.

“Glypican 5 es un gen de respuesta al Interferón Beta en pacientes con Esclerosis Múltiple”.

V. de las Heras, M. Cenit, M. Bartolome, F. Blanco-Kelly, R. Alvarez-Lafuente, A. Martinez, A. Garcia-Martinez, E. De la Concha, E. Urcelay, A. Rafael.

LXI Reunión anual de la Sociedad Española de Neurología. Barcelona, 17-21 de noviembre, 2009.

“Expresión de CD46 e infección por HHV6 en pacientes con Esclerosis Múltiples tratados con Interferón Beta”.

M. Garcia-Montojo, F. Blanco-Kelly, M.I. Dominguez Mozo, A. Martinez, V. de las Heras, M. Lopez-Cavanillas, A. Garcia-Martinez, , E. De la Concha, M. Bartolome, E. Urcelay, A. Rafael, R. Alvarez-Lafuente.



*Cuanto más grande es el caos, más próxima está la solución.*

*Mac Ise-Tung (1893-1976)*

